

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭64-85084

⑬ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和64年(1989)3月30日

C 12 N. 15/00

A-8412-4B

5/00

B-8515-4B

C 12 P 21/02

C-6712-4B ※審査請求 未請求 発明の数 8 (全41頁)

⑭ 発明の名称 プロテインCの発現

⑮ 特 願 昭62-271959

⑯ 出 願 昭62(1987)10月29日

優先権主張 ⑰ 1986年10月29日 ⑱ 米国(US) ⑲ 924462

⑳ 発 明 者 ドナルド シー. フォスター アメリカ合衆国, ワシントン 98115, シアトル, ノース
 ⑳ 発 明 者 マーク ジェイ. マレー アメリカ合衆国, ワシントン 98102, シアトル, イレブ
 ㉑ 出 願 人 ザイモジエネテイク アメリカ合衆国, ワシントン 98103, シアトル, ノース
 ス, インコーポレイテッド サーティーファイフス ストリート 2121

㉒ 代 理 人 弁理士 青 木 朗 外4名
 最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

プロテインCの発現

2. 特許請求の範囲

1. ヒトプロテインC又は活性化されたヒトプロテインCと実質的に同一の生物学的活性を有する蛋白質をコードし、さらに軽鎖及び重鎖間の開裂部位にあるアミノ酸配列 (R_1), $-R_2-R_3-R_4$ (式中、 R_1, R_2, R_3 、及び R_4 はLys 又はArg であり、そして n は 0, 1, 2 又は 3 である) をコードするDNA配列。

2. 前記アミノ酸配列が軽鎖及び重鎖の間の開裂部位にあるArg-Arg-Lys-Argである特許請求の範囲第1項に記載の~~方法~~^{DNA配列}。

3. ヒトプロテインC又は活性化されたヒトプロテインCと実質的に同一の生物学的活性を有する蛋白質をコードし、さらにファクターVII、ファクターIX、ファクターX、プロトロンビン及びプロテインSから成る群から選ばれた蛋白質のプレプロペプチドをコードするDNA配列。

4. ヒトプロテインC又は活性化されたヒトプロテインCと実質的に同一の生物学的活性を有する蛋白質であって、残基 158がAla, Ser, Thr 及び Gly から成る群から選ばれた非酸性アミノ酸残基で置き換えられているものをコードするDNA配列。

5. ヒトプロテインC又は活性化されたヒトプロテインCと実質的に同一の生物学的活性を有する蛋白質であって、残基 154がLys 及びArg から成る群から選ばれた塩基性アミノ酸残基により置き換えられているものをコードするDNA配列。

6. ヒトプロテインC又は活性化されたヒトプロテインCと実質的に同一の生物学的活性を有する蛋白質であって、残基 156-157の Lys-Asp が Lys-Lys 又は Arg-Arg により置き換えられているものをコードするDNA配列。

7. 哺乳類宿主細胞DNA中に組み込まれ得る発現ベクターであって、プロモーター、該プロモーターに続きその下流に特許請求の範囲第1項～第6項に記載のDNA配列が存在し、該DNA配

列に続いてその下流にポリアデニレーションシグナルが存在し、該DNA配列の転写が前記プロモーターにより指令される、前記発現ベクター。

8. 特許請求の範囲第7項に記載の発現ベクターによりトランスフェクトされた哺乳類細胞。

9. 前記細胞がCOS細胞、BHK細胞、ラットHep I細胞、ラットHep II細胞、ヒト肺細胞、ヒト肝癌細胞、HepG2細胞、マウス肝細胞、DUKX細胞及び293細胞から成る群から選ばれたものである特許請求の範囲第8項に記載の細胞。

10. 活性化されたヒトプロテインCと実質的に同一の構造及び／又は生物学的活性を活性化後に有する蛋白質の製造方法であって、

特許請求の範囲第7項に記載の発現ベクターを哺乳類宿主細胞に導入し；

該哺乳類宿主細胞を適当な培地で増殖せしめ；
そして

前記発現ベクターにコードされておりそして前記哺乳類宿主細胞により生産された蛋白質生成物を単離する；

前記DNA配列によりコードされておりそして前記BHK宿主細胞により生産された蛋白質生成物を単離する；

ことを含んで成る方法。

13. 前記発現ベクターと共に選択マーカーを前記宿主細胞に導入することをさらに含んで成る特許請求の範囲第10項～第12項のいずれか1項に記載の方法。

14. 前記蛋白質生成物を活性化して、活性化されたヒトプロテインCと実質的に同一な生物学的活性を有する蛋白質を生成せしめる段階をさらに含んで成る特許請求の範囲第10項～第12項のいずれか1項に記載の方法。

15. 前記活性化段階が、 α -トロンビン、トリプシン及びヘビ毒活性化因子から成る群から選ばれたプロテアーゼによる前記蛋白質生成物の開裂を含んで成る、特許請求の範囲第14項に記載の方法。

以下余白

ことを含んで成る方法。

11. 前記細胞がCOS細胞、BHK細胞、ラットHep I細胞、ラットHep II細胞、TCMK細胞、ヒト肺細胞、ヒト肝癌細胞、HepG2細胞、マウス肝細胞、DUKX細胞及び293細胞から成る群から選ばれたものである特許請求の範囲第10項に記載の方法。

12. 活性化されたヒトプロテインCと実質的に同一の構造及び／又は生物学的活性を活性化後に有する蛋白質の製造方法であって、

BHK宿主細胞DNAに組み込まれ得る発現ベクターをBHK宿主細胞に導入し、この発現ベクターはプロモーター、該プロモーターに続きその下流に存在する特許請求の範囲第1項、第5項又は第6項のいずれかに記載のDNA配列、及び該DNA配列に続きその下流に存在するポリアデニレーションシグナルを含有し、前記DNA配列の転写が前記プロモーターにより指令され；

前記BHK宿主細胞を適当な培地中で増殖せしめ；そして

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

この発明は一般に血漿蛋白質及びそれらをコードするDNA配列に関し、そしてさらに詳しくはヒトプロテインC又は活性化されたヒトプロテインCと実質的に同一の構造及び／又は活性を有する蛋白質に関する。

(従来の技術)

プロテインCは、生体内での血液凝固及びフィブリン溶解活性の発生において重要な役割を演ずるセリンプロテアーゼのチモーゲン又は前駆体である。このものは肝臓中で単鎖ポリペプチドとして合成され、このポリペプチドはかなりのプロセッシングを受けてジスルフィド結合により一緒に保持された重鎖($M_r = 40,000$)及び軽鎖($M_r = 21,000$)を含んで成る2本鎖分子となる。循環中のこの2本鎖中間体は、重鎖のアミノ末端からの12残基ペプチドのトロンビン介在開裂により、
“活性化されたプロテインC”(APC)として

知られる生物学的に活性な形の分子に転換される。この開裂反応は生体内において内皮細胞補因子であるトロンボモドリン (thrombomodulin) により増強される (Esmon 及び Owen, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2249-2252, 1981)。

プロテインCは、それぞれグルタミン酸及びアスパラギン酸残基の翻訳後修飾によって形成されるおよそ9残基の β -カルボキシグルタミン酸

(Gla)及び1残基の β -ヒドロキシアスパラギン酸を含有するビタミンK-依存性の糖蛋白質である。プロテインC中の特定の γ -カルボキシグルタミン酸残基の翻訳後形成はビタミンKを必要とする。これらの異常アミノ酸残基はカルシウムイオンに結合し、そしてプロテインCの生物学的活性のために必要とされるリン脂質と該蛋白質との相互作用を担当するものと信じられる。

ファクターVII、ファクターIX及びファクターXのごとき他のビタミンK依存性血漿蛋白質の凝固促進作用とは対照的に活性化されたプロテインCは限定された蛋白質分解によるファクターVa及

びファクターVIIaの不活性化を介して凝固過程の制御剤として機能する。プロテインCによるファクターVa及びVIIaの不活性化は酸性リン脂質及びカルシウムイオンの存在に依存する。プロテインSはAPCで触媒されるファクターVaの蛋白質分解を促進することによりこの活性化を制御するものと報告されている (Walker, J. Biol. Chem. 255:5521-5524, 1980)。

プロテインCはまた組織型プラスミノゲン活性化因子の作用と関連している (Kisiel及び Fujikawa, Behring Inst. Mitt. 73:29-42, 1983)。ウシAPCのイヌへの注入によりプラスミノゲン活性化因子の活性が上昇する (Comp及び Esmon, J. Clin. Invest. 68:1221-1228, 1981)。最近の研究 (Sakata等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:1121-1125, 1985)によれば、培養された内皮細胞へのAPCの添加は、該細胞によるウロキナーゼ関連プラスミノゲン活性化因子及び組織型プラスミノゲン活性化因子の両者の活性の上昇を反映して、条件化培地中でのフィブリン溶解活

性の急速な投与量依存的上昇を導く。APC処理はまた、抗活性化因子の活性の量依存的低下をもたらす。

プロテインC不足は再発血栓性疾患と関連し (Broekmans等, New Eng. J. Med. 309:340-344, 1983; 及び Seligsohn等, New Eng. J. Med. 310:559-562, 1984)、そして遺伝的欠陥から、又は肝疾患もしくは外科手術のごとき傷害から生ずるであろう。この状態は一般に経口抗凝固剤により治療される。プロテインCを含有する正常血漿の注入によっても有利な効果が得られている (Gardiner 及び Griffin, Prog. in Hematology, Brown, Grune 及び Stratton 編, NY, 13:265-278を参照のこと)。さらに、若干の研究者は、プロテインCの抗凝固活性が静脈血栓症のごとき血栓性疾患の治療において有用であることを見出した (Smith等, PCT公開No. W085/00521)。世界のあちこちで16,000の個体中およそ1個体がプロテインC不足状態にあると推測される。

最後に、外来プロテインCはグラム陰性敗血症

の凝血異常効果及び致死的效果を防止することが示された (Taylor等, J. Clin. Invest. 79:918-925, 1987)。ヒヒを用いた研究から得られたデータは、プロテインCが敗血症に対する保護において自然の役割を演ずることを示している。

天然プロテインCは凝固因子濃縮物から (Marlar 等, Blood 59:1067-1072) 又は血漿から (Kisiel, 前掲) 精製することができようが、出発材料の入手の可能性が限定されていること、血漿中のプロテインC濃度が低いこと等のため、この方法は複雑且つ高価である。さらに、ヒトの血液に由来する生成物の療法的使用は、例えば肝炎ウイルス、サイトメガロウイルス、又は後天性免疫不全症候群 (AIDS) の病原体による病気の伝染の危険性を伴う。血栓性疾患の治療におけるプロテインCの臨床的適用の観点から、有用量のプロテインC及び活性化されたプロテインCを製造することは明らかに価値あることである。

以下余白

〔発明の概要〕

要約すれば、この発明はヒトプロテインC又は活性化されたヒトプロテインCと実質的に同一の構造及び／又は生物学的活性を有する蛋白質をコードするDNA配列を開示する。この発明の1つの観点に従えば、このDNA配列はさらに、軽鎖及び重鎖の開裂部位におけるアミノ酸配列

$(R_1)_n - R_2 - R_3 - R_4$ (式中、 R_1, R_2, R_3 及び R_4 はLys 又はArg であり、そして n は1, 2, 又は3である) をコードする。好ましい態様においては、開裂部位における前記アミノ酸配列は Arg-Arg -Lys -Arg である。この発明の他の態様においては、この蛋白質はAla, Ser, Thr 又は Gly のとき非-酸性アミノ酸残基による残基158 (Asp) の置き換えを含む。関連する観点において、この蛋白質はLys 又はArg のとき塩基性アミノ酸残基による残基154 (His) の置き換えを含む。他の観点において、この蛋白質は Lys-Lys 又は Arg-Arg による天然プロテインCの残基156-157の Lys-Arg の置き換えを含む。

る。この発現ベクターはまた一組のRNAスプライス部位も含むことができる。

この発明の関連する観点は、活性化されたヒトプロテインCと実質的に同一の生物学的活性を活性化後に有する蛋白質を発現するためにトランスフェクトされた哺乳類細胞を開示する。哺乳類宿主細胞DNAに組み込まれ得る発現ベクターにより哺乳類細胞がトランスフェクトされ、この発現ベクターはプロモーター及びその下流に続く前記のDNA配列を含有する。1つの具体例において、選択マーカーがさらに細胞に導入され、そして安定にトランスフェクトされた細胞が選択される。活性化されたヒトプロテインCと実質的に同一の生物学的活性を有する蛋白質を発現するためにトランスフェクトされた哺乳類細胞も開示される。この発明において使用するために好ましい宿主細胞はCOS細胞、BHK細胞及び293細胞である。

この発明の他の観点は、活性化されたヒトプロテインCと実質的に同一の生物学的活性を活性化後に有する蛋白質の製造方法を開示する。この方

この発明の他の観点は、ヒトプロテインC又は活性化されたヒトプロテインCと実質的に同一の生物学的活性を有する蛋白質をコードし、さらにファクターVII、ファクターIX、ファクターX、プロトロンビン又はプロテインSのごとき蛋白質のプレプロペプチドをコードするDNA配列に向けられる。

さらに、この発明は哺乳類宿主細胞のDNA中に組み込まれ得る発現ベクターを開示し、このベクターはプロモーター、及びこれに続きこの下流に存在する、ヒトプロテインC又は活性化されたヒトプロテインCと実質的に同一な構造及び／又は活性を有する蛋白質をコードする前記のごとくDNA配列を含有し、該スクレオチド配列の転写は前記プロモーターにより指令される。このスクレオチド配列に続くその下流にポリアデニレーションシグナルが存在する。1つの態様においては、前記スクレオチド配列とポリアデニレーションシグナルとの間に選択マーカーを含有し、該選択マーカーの転写が前記プロモーターにより指令され

法は、(a) ヒトプロテインCと実質的に同一の構造及び／又は活性を有する蛋白質をコードする前記のDNA配列を含んで成る発現ベクターを哺乳類宿主細胞に導入し；(b) この哺乳類宿主細胞を適当な培地中で増殖せしめ；そして(c) 前記DNA配列にコードされておりそして前記哺乳類動物細胞により生産された蛋白質生成物を単離する、ことを含んで成る。この方法に従って製造される蛋白質生成物も開示される。活性化されたヒトプロテインCと実質的に同一の構造及び／又は生物学的活性を有する蛋白質の製造方法もまた開示される。

この発明において記載される蛋白質は活性療法物質として使用され、この使用には血液凝固の制御における使用が含まれる。さらに、これらの蛋白質は生理的に許容されるキャリアー及び／又は稀釈剤と混合され、適当な医薬組成物が提供される。

この発明の他の観点は以後の詳細な記載及び添付された図面により明らかになるであろう。

〔具体的な説明〕

この発明を記載するに先立ち、これ以後に使用する若干の用語の定義を記載することが発明の理解に役立つであろう。

生物学的活性

生物学的関連において（すなわち、生物体において、又はインビトロでの模倣において）分子により行われる1つの機能又は一組の機能。蛋白質の生物学的活性は触媒的活性とエフェクター活性に分けられる。ビタミンK依存性血漿蛋白質の触媒活性は一般に他の血漿蛋白質の特異的蛋白質分解的開裂による該基質の活性化又は不活性化を含む。エフェクター活性は、カルシウム、リン脂質もしくは他の小分子、巨大分子、例えば蛋白質、又は細胞への生物学的に活性な分子の特異的結合を含む。エフェクター活性はしばしば、生理的条件下で触媒活性を増強するか、又はそのために必須である。

プロテインCについては、生物学的活性はその抗凝固活性及びフィブリン溶解性により特徴付け

られる。プロテインCは活性化された場合、リン脂質及びカルシウムの存在下でファクターVa及びファクターVIIaを不活性化する。プロテインSはこの機能の制御に関与するようである。(Walker、前掲)。活性化されたプロテインCはまたフィブリン溶解を増強し、この効果はプラスミノーゲン活性化因子阻害剤のレベルの低下により介在されると信じられる(van Hinsbergh等、Blood 65: 444-451, 1985)。あとで詳細に記載するように、プロテインCのエクソンVII及びVIIIによりコードされているプロテインCの部分がこの触媒活性を主として担当する。

ブレイブローベプチド

幾つかの蛋白質のアミノ末端に存在し、そして一般にトランスロケーションの際に蛋白質から開裂されるアミノ酸配列。ブレイブローベプチドは蛋白質を細胞の分泌経路に向ける配列（シグナル配列）を含み、そして疎水性アミノ酸のコアーの存在により特徴付けられる。これらはまたプロセッシングシグナルを含有する。この明細書において使

用する場合、「ブレイブローベプチド」なる語はまた天然ブレイブローベプチドの部分をも意味する。

発現ユニット

注目の蛋白質をコードする一次ヌクレオチド配列を、該一次ヌクレオチド配列の転写を指令しそして調節する他のヌクレオチド配列と共に含んで成るDNA造成物。発現ユニットは少なくとも1個の一次ヌクレオチド配列、並びに該一次ヌクレオチド配列の上流に位置しそしてそれに作用可能に連結されているプロモーター配列及び下流に位置するポリアデニレーションシグナルから成る。発現の効率を高めるために追加の遺伝子要素を含めることもできる。これらの要素にはエンハンサー配列、リーダー及びmRNAスプライス部位が含まれる。

発現ベクター

注目の蛋白質をコードするDNA配列を、プロモーター及び該蛋白質の発現を促進する他の配列と共に含んでなるDNA分子。発現ベクターはさらに、自律複製により又は宿主のゲノムへの取り

込みにより宿主細胞中での複製をもたらす遺伝情報を含む。組換えDNAにおいて一般に使用される発現ベクターの例としてプラスミド及び幾つかのウイルスが挙げられるが、両者の要素を含むこともできる。これらはまた選択マーカーを含むことができる。

前記のごとく、プロテインCは肝臓で生産され、そしてその生合成のためにビタミンKを必要とする。ビタミンKは軽鎖のアミノ末端領域中の特定の γ -カルボキシグルタミン酸残基の形成のために必要である。これらのアミノ酸残基は翻訳後修飾によって形成され、そしてリン脂質へのカルシウム介在結合のために必要とされる。さらに、プロテインCは1個の β -ヒドロキシアスパラギン酸残基を含有し、このものもやはり翻訳後修飾により形成される。しかしながら、このアミノ酸残基の役割は知られていない。

プロテインCの活性が特定のグルタミン酸残基の γ -カルボキシル化を含む翻訳後修飾、及び2本鎖形への開裂に依存し、そしてさらに特定のA

スバラギン酸のヒドロキシル化に依存するとすれば、微生物でのプロテインCのクローニング及び発現により活性な生成物を製造することはできそうにない。

従って、この発明は、 γ -カルボキシル化されており活性化されたヒトプロテインCの生物学的活性を活性化後に有する蛋白質を、該蛋白質を安定に発現するようにトランスフェクトされた哺乳類細胞を用いて製造する方法を提供する。

この発明はさらに、 γ -カルボキシル化されており、そして活性化を必要とすることなく活性化されたヒトプロテインCの生物学的活性を有する蛋白質の製造方法を提供する。

ウシプロテインCの軽鎖及び重鎖が配列決定されている(Fernlund 及び Stenflo, *J. Biol. Chem.* 257: 12170-12179, 1982; 並びに Stenflo 及び Fernlund, *J. Biol. Chem.* 257: 12180-12190, 1982)。ヒトプロテインCの単離及び特徴付けが Kisiel, *J. Clin. Invest.* 64: 761-769, 1979 により記載されている。ヒト及びウシの両者の酵

素の抗凝固活性は高度に種特異的であることが見出された。種特異性はプロテインSにより介在されると信じられる(Walker, *Thromb. Res.* 22: 321-327, 1981)。しかしながら、ヒト及びウシの蛋白質は相互に、そしてプロトロンビン、ファクターVII、ファクターIX及びファクターXを含む他のビタミンK-依存性血漿蛋白質と、かなりの全体的構造相同性を示す。類似点は軽鎖中のG1a残基の存在及び重鎖中の活性部位セリンの存在、並びに軽鎖のアミノ末端領域の他のアミノ酸配列の相同性を含む。

この発明においては、ヒト肝mRNAから λ gt11 cDNAライブラリーを調製した。次にこのライブラリーをヒトプロテインCに対する 125 I-ラベル化抗体によりスクリーニングした。抗体反応性クローンはさらに、 λ gt11ベクターにおける β -ガラクトシダーゼ及びプロテインCの融合蛋白質の合成について分析された。

クローンの1つが抗体プローブによる強いシグナルを与え、そして約1400bpの挿入部を含有する

ことが見出された。DNA挿入部のDNA配列分枝は、Fernlund及びStenflo (*J. Biol. Chem.* 257: 12170-12179; 並びに *J. Biol. Chem.* 257: 12180-12190)により決定されたウシプロテインCの多くの部分と高度の相同性を示す推定アミノ酸配列を示した。

このDNA挿入部は、軽鎖のアミノ酸64から始まり、完全な重鎖コード領域を含みそして終止コドンに至るプロテインCのためのコード領域の大部分を含んでいた。さらに、重鎖の終止コドンに続き294塩基対の3'非コード配列及び9塩基対のポリ(A)テイルが存在した。プロセッシング又はポリアデニレーションシグナルA-A-T-A-A-AはこのcDNA挿入部のポリ(A)テイルから13塩基対上流に存在した。この配列は2個の可能性あるポリアデニレーション部位の1つであった。

このcDNA配列はまた位置156-157(アミノ酸の番号は第2図に示されている)のジペプチドLys-Argをコードし、このジペプチドは軽鎖を重鎖から分離し、そしてプロセッシングの過程で蛋白質分

解的開裂により除去され、二本鎖分子の分泌をもたらす。トロンビンによる二本鎖分子の活性化の後、ヒトプロテインCの重鎖はアルギニン169及びロイシン170の間で開裂し、活性化ペプチド(第2図)を放出する。

類似の方法により、ブレイクペプチド及びプロテインCの最初の23アミノ酸のコード配列を欠く第二のcDNAが単離された。このcDNAをハイブリダイゼーションプローブとして用いてコード配列の残りの部分を λ シャロン4A中ヒトゲノムDNAライブラリー(Foster等、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 4673-4677, 1985)から得た。プロテインC遺伝子のオーバーラップする挿入部を含有するこれらの異なる λ シャロン4Aファージを単離した。

3個のファージクローン上のエクソンの位置が、これらのクローンの消化物と上記の1400bp cDNAから作られたブローグとのサザンハイブリダイゼーションにより決定された。これらのクローン中のゲノムDNA挿入部を、1回又は2回の制限酵

素消化及びこれに続くアガロースゲル電気泳動、サザンブロッティング、並びにヒトプロテインCのcDNAに由来する放射能ラベルされた5'プローブ及び3'プローブへのハイブリダイゼーションにより、第3図に示すようにマップした。

DNA配列決定研究はジデオキシ・チエイノターミネーション法を用いて行った。第4図に示すように、ヒトプロテインCの遺伝子のヌクレオチド配列はおおよそ11kbのDNAにわたる。これらの研究はさらに42アミノ酸の可能性あるブレープロペプチドを示した。このブレープロ配列は位置-25のGly残基の後でシグナルペプチダーゼにより開裂される。成熟蛋白質へのプロセッシングは、残基-1の後の追加の蛋白質分解的開裂によるアミノ末端プロペプチドの除去、並びに残基155及び157における開裂による、軽鎖と重鎖を連結するLys-Argジペプチドの除去を含む。この最後のプロセッシングが155アミノ酸の軽鎖及び262アミノ酸の重鎖をもたらす。

プロテインC遺伝子は25~885ヌクレオチドの

サイズの8個のエクソン、及び92~2668ヌクレオチドのサイズの7個のイントロンから成る。エクソンI及びエクソンIIの一部分がブレープロペプチドの42アミノ酸をコードする。エクソンIIの残りの部分、エクソンIII、エクソンIV、エクソンV、及びエクソンVIの一部分がプロテインCの軽鎖をコードする。エクソンVIIの残りの部分、エクソンVIII、及びエクソンIXがプロテインCの重鎖をコードする。ヒトプロテインCをコードするcDNAのDNA配列及びアミノ酸配列を第2図に示す。

プロテインCの遺伝子のイントロンは主として、種々の機能的ドメインの間に位置する。エクソンIIはブレープロペプチドの高度に保存された領域及びγ-カルボキシグルタミン酸(Gla)ドメインを含む。エクソンIIIはGlaと増殖因子ドメインを結ぶ8個のアミノ酸を含む。エクソンIV及びVはそれぞれ可能性ある増殖因子ドメインを示し、他方エクソンVIは活性化ペプチドを含む連結領域をカバーする。エクソンVII及びVIIIはすべてのセリンプロテアーゼに典型的な触媒的ドメインを

カバーする。

ヒトブレープロテインCのアミノ酸配列及び提案された構造を第5図に示す。プロテインCが、軽鎖及び重鎖を結ぶLys-Argジペプチドを伴わないで示されている。7個のイントロン(A~G)の位置が実線で示されている。既知の蛋白質分解的開裂部位を挟むアミノ酸が円で囲んである。軽鎖中の第一アミノ酸、活性化ペプチド及び重鎖が1番から始まる。この番号は第2図及び第4図中に示される番号とは異なる。

炭水化物付加部位は軽鎖中の残基97、並びに重鎖中の残基79、144及び160に位置する。この番号は第5図によるものである。炭水化物成分はAsnに共有結合される。多くの場合、炭水化物付加環境はAsn-X-Ser又はAsn-X-Thr(式中、Xは任意のアミノ酸である)により表わすことができる。

前記のごとく、プロテインCは凝固過程において制御的役割を演ずる。エクソンVII及びVIIIによりコードされる触媒ドメインは幾つかの血漿蛋白質

(例えばファクターVa及びVIIIa)を特異的に開裂せしめることによりこれらを不活性化するセリンプロテアーゼ活性を有する。この選択的蛋白質分解の結果として、プロテインCは抗凝固活性及びフィブリン溶解活性を示す。

ゲノムクローン中に介在配列が存在するため、許容される発現ユニットを造成するためには単にゲノム配列とcDNA配列とを連結して完全なコード配列を得るだけでは十分でない。従って、発現ユニットの造成のためにゲノムクローンを使用する場合、後でさらに詳細に記載する理由により、これらの介在配列を除去することが必要である。

5'コード領域はまた他の方法で得ることができ、そして介在配列を除去する必要性が排除される。既存のcDNA又はゲノムクローン由来のプローブを用いて、追加のライブラリーから5'コード領域を得ることができる。この方法により十分な長さのcDNAが得られた。さらに、ビタミンK依存性血漿蛋白質のアミノ末端部分はそれらのそれぞれのカルシウム結合活性を担当する。この機能的

相同性の結果として、これらの分子のカルシウム結合ドメインは交換可能であり、そしてなお生ずる分子の触媒ドメインに特異的な活性を維持することが見出された。例えば、1985年4月17日出願された米国特許出願№724,311 明細書中に記載されており、そしてヨーロッパ出願№200,421 として公開されているように、ファクターⅨのアミノ末端部分（カルシウム結合ドメイン）をアミノ酸38においてファクターⅦに連結してファクターⅦの活性を有する蛋白質を生成せしめることができる。ファクターⅦ、ファクターⅨ、ファクターⅩ、プロトロンビン及びプロテインSは、このアミノ末端配列のプロテインCとの相同性を共有する。従って、これらの蛋白質のいずれかの遺伝子の5'コード領域を含んで成るコード配列をプロテインC遺伝子の対応する配列の代りに使用することができよう。さらに、幾つかのビタミンK依存性血漿蛋白質の既知のアミノ酸配列に基いて、又はこの明細書に開示するプロテインCの配列に基いて適当なコード配列を合成することができる。

このようにして得られた配列は、好ましくは連続するオープンリーディングフレームの形であるべきである。すなわち、高等真核性遺伝子中に一般に存在する介在配列（イントロン）を欠いているべきである。クローン化された遺伝子中のイントロンの存在は、遺伝子配列が哺乳類宿主細胞に導入された場合に、メッセンジャーRNAの異常なスプライシング及び／又は遺伝子発現の効率低下、又は増幅の不安定化を導くであろう。この発明に従って生産されるプロテインCの適当なプロセッシング及び分泌を促進するために、このコード配列がさらにブレイブプロペプチドをコードすることが好ましい。ブレイブプロペプチドはプロテインCのそれでもよく、又はファクターⅨ、ファクターⅦもしくはプロトロンビンのごとき他の分泌される蛋白質のそれでもよい。

幾つかの場合、活性化されたプロテインCを直接生産し、これによって蛋白質生成物をインビトロ又はインビボにおいて活性化する必要性を排除することが望ましいであろう。プロテインCの成

合成ヌクレオチド配列を製造する方法は当業界においてよく知られている。例えば、一組のオーバーラップするオリゴヌクレオチドを合成し、そしてアニールして対になりオーバーラップする接着末端を有する二本鎖断片を得ることができる。次に、これらの断片を制限断片と同様にして連結する。次に、得られる合成断片を便利な制限部位においてcDNAに連結する。連結配列は、必要であれば、オリゴヌクレオチド指令変異誘発により変形することができる。

完全なコード配列を代表する複数のクローンが得られており、必要であれば、適当な領域を連結して所望のコード配列を生じさせることができる。1又は複数のライブラリーから得られた複数の断片を適当な制限エンドヌクレアーゼで切断し、そして適切な方向に酵素的に連結する。断片及び選択される適当な制限エンドヌクレアーゼに依存して、欠失変異の“ブールアウド”法により、又は制限酵素開裂と変異誘発との組合わせにより、不所望のDNA配列を除去することが必要である。

熟及び活性化に関与する開裂部位は知られている（Foster及びDavie、前掲）。オリゴヌクレオチド指令欠失変異誘発により活性化ペプチドコードする領域を除去することにより、APCをコードする配列を造成することができる。次に、こうして得られる蛋白質は、宿主細胞の分泌経路での正常の蛋白質分解的プロセッシングの間のLys-Argジペプチドの除去により活性化されるであろう。活性化ペプチドを欠く蛋白質はそれにもかかわらず宿主細胞により適切にプロセッシングされ、活性化されたプロテインCの分泌がもたらされることが見出された。

組換プロテインCのその二本鎖形への成熟に関与する蛋白質分解的プロセッシングを増強するため、プロセッシング部位周辺のアミノ酸配列を変更することが望ましいであろう。この様な変更がトランスフェクトされた細胞中での組換プロテインCの適切なプロセッシングを促進することが見出された。

単鎖プロテインCが血流中で活性化されることが知られていないので、効果的な開裂が蛋白質の

比活性を上昇せしめるであろう。すでに記載したように、この成熟過程はジペプチド Lys-Arg

(アミノ酸156-157)の除去を含む (Foster及び Davie, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 : 4766-4770, 1984)。このプロセシング部位の近傍におけるアミノ酸配列の変更はアミノ酸の置換及び/又は挿入を含む。変更の1つのこの様な群は、配列 $(R_1)_n - R_2 - R_3 - R_4$ (式中、 R_1, R_2, R_3 及び R_4 は Lys又はArg であり、そして n は 0, 1, 2 又は 3 である) を天然の Lys-Arg ジペプチドの代りに含有するようにアミノ酸配列を変更することである。この群の特に好ましい変更は配列

Arg-Arg-Lys-Arg である。この配列は、トランスフェクトされた BHK 細胞中で組換プロテインCのプロセシングを約5倍増強することが見出された。変更の第2の群は、天然プロテインCのアミノ酸残基 154 (His) を塩基性アミノ酸残基 (すなわち、Lys 又は Arg) で置き換えて一般式 $R_1 - X - R_2 - R_3$ (式中、 R_1, R_2 及び R_3 は Lys 又は Arg であり、そして X は Lys 又は Arg 以

外のアミノ酸、好ましくは Leu である) のプロセシング部位配列を得ることを含む。変更の第三群は、158 位の Asp 残基を非-酸性アミノ酸残基で置き換えることを含む。小さい中性アミノ酸、例えば Ala, Ser, Tyr 又は Gly を使用するのが好ましい。変更の第四群は天然プロテインCの Lys-Arg を Lys-Lys 又は Arg-Arg により置き換えることを含む。変更のこれらの群の組合わせを行うこともできる。例えば、配列 $(R_1)_n - R_2 - R_3 - R_4$ を有するプロセシング部位を含有するプロテインC分子中でアミノ酸 158 を置き換えることができる。これらの置き換えは野性形プロテインC又は活性化されたプロテインCの製造において使用することができる。

プロテインC又は活性化されたプロテインCのためのコード配列を、次に適当な発現ベクターに挿入し、今度はこのベクターを用いて哺乳類セルラインをトランスフェクトする。この発明を実施するための発現ベクターは哺乳類細胞に導入された外来遺伝子の転写を指令することができるプロ

モーターを含むであろう。転写を指令する場合の効率のためウイルスプロモーターが好ましい。特に好ましいプロモーターはアデノウイルス2からの主要後期プロモーターである。この様な発現ベクターはまた、好ましくは、プロモーターの下流であってプロテインC配列の挿入のための部位の上流に、又はプロテインC配列自体の中に位置する一セットのRNAスプライス部位を含有するであろう。好ましいRNAスプライス部位はアデノウイルス遺伝子及び/又は免疫グロブリン遺伝子から得ることができる。挿入部位の下流に位置するポリアデニレーションシグナルも発現ベクター中に含まれる。ウイルスポリアデニレーションシグナル、例えばSV40からの初期もしくは後期ポリアデニレーションシグナル、又はアデノウイルス5E1b領域からのポリアデニレーションシグナルが特に好ましい。特に好ましい態様においては、発現ベクターはさらに非コードウイルスリーダー配列、例えばアデノウイルス2三分節

(tripartite) リーダーを、プロモーター及び

RNAスプライス部位の間に含む。好ましいベクターはさらにエンハンサー配列、例えばSV40エンハンサー配列及びアデノウイルスVA RNAをコードする配列を含有することができる。

次に、クローン化された遺伝子配列を、例えばリン酸カルシウム介在トランスフェクション

(Wigler等, Cell 14 : 725, 1978; Corsaro 及び Pearson, Somatic Cell Genetics 7 : 603,

1981; Graham 及び Van der Eb, Virology 52 : 456, 1973) により、培養された哺乳類細胞に導入する。DNA及びリン酸カルシウムから沈澱を生成せしめ、そしてこの沈澱を細胞に適用する。細胞の幾らかがDNAを取り込み、そしてそれを数日間細胞内に保持する。これらの細胞の小部分 (典型的には 10^{-4}) がDNAをゲノムに組み込む。これら組み込み体 (integrant) を固定するため、選択表現型を支える遺伝子 (選択マーカー) を注目の遺伝子と共に細胞中に導入するのが一般的である。好ましい選択マーカーは、薬剤、例えばネオマイシン、ハイグロマイシン、及びメトト

レキセートに対する耐性を付与する遺伝子を包含する。選択マーカーは注目の遺伝子と同時に別個のプラスミド上で細胞に導入することができ、あるいはそれらは同一のプラスミド上で導入することができる。同一のプラスミド上では選択マーカー及び注目の遺伝子は異なるプロモーター又は同一のプロモーターの制御のもとにあることができる。1つの態様においては、両者の配列が同一のプロモーターにより制御されるように選択マーカーがプロテインCコード配列と同じプラスミド上に置かれ、これはジストロンメッセージとして知られる配置である。このタイプの造成物は従来技術において知られている（例えば、ヨーロッパ出願公開№117,058）。細胞に導入される混合物に“キャリアDNA”として知られる追加のDNAを加えることも有利である。細胞がDNAを取り込んだ後、これらを一定時間、典型的には1～2日間増殖せしめて注目の遺伝子の発現を開始せしめる。次に、薬剤選択を適用して適切に選択マーカーを発現している細胞の増殖について選択を行う。

293細胞と共に使用するための好ましい発現ベクターはアデノウイルスプロモーターを含有するであろう。ネオマイシン耐性が293細胞中で使用するための好ましい選択マーカーである。好ましいBHKセルラインはtk⁻BHKセルラインBHK570 (Waechter 及び Baserga, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 1106-1110, 1982) である。

組み込まれた遺伝子配列のコピー数は、ある種の選択マーカー（例えば、メトトレキセートに対する耐性を付与するジヒドロフォレートレダクターゼ）の使用による増幅を介して増加せしめることができる。選択マーカーが注目の遺伝子と共に細胞に導入され、そして薬剤選択が適用される。次に、薬剤濃度を段階的に増加せしめ、各段階で耐性細胞を選択する。クローン化された配列のコピー数の増加について選択することにより、コードされた蛋白質の発現レベルが実質的に増加することができる。

この発明に従って製造されるプロテインCは好ましくは、例えば抗-プロテインC抗体カラム上

の様な細胞のクローンをプロテインCの発現についてスクリーニングすることができる。

この発明において使用するために好ましい哺乳類セルラインにはCOSセルライン、BHKセルライン及び293セルラインが含まれる。さらに、この発明において多くの他のセルラインを使用することができ、これらにはラットHep I細胞(ATCC CRL 1600)、ラットHep II細胞(ATCC CRL 1548)、TCMK細胞(ATCC CCL 139)、ヒト肺細胞(ATCC CCL 75.1)、ヒト肝癌細胞(ATCC HTB-52)、Hep G2細胞(ATCC HTB 8065)、マウス肝細胞(ATCC CC 29.1)、及びDUKX細胞(Urtaub及びChasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220, 1980)が含まれる。

293セルライン(ATCC CRL 1573; Graham等、J. Gen. Virol. 36: 59-72, 1977)が特に好ましい。プロテインCを二本鎖形に効率的にプロセシングするその能力のためである。このセルラインはヒトアデノウイルス5 DNAにより形質転換され、そしてAd5 EIA 遺伝子をゲノムに組み込む。

でのアフィニティークロマトグラフィーにより精製される。カラム溶出物の追加の精製は常用の化学的精製手段、例えば高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により達成することができる。

この発明に従って製造されるプロテインCは重鎖のアミノ末端から活性化ペプチドを除去することにより活性化することができる。活性化はオートロンビン(Marlar等、Blood 59: 1067-1072, 1982)、トリプシン(Marlar等、前掲)、ルッセル(Russell)のまむし毒ファクターX活性化因子(Kisiel、前掲)、又は市販のヘビ毒由来活性化因子Protac C (American Diagnostica) の存在下でプロテインCをインキュベートすることにより達成することができる。

下記の例を要約すれば、例1はヒトプロテインCをコードするDNA配列のクローニングを記載する。例2は例1において単離された配列からの、プロテインCの全長コード配列の造成を記載する。例3はプロテインC DNA のための発現ベクター造成を記載する。例4はトランスフェクトされた哺

乳類細胞を用いるプロテインCの製造を記載する。例5はプロテインCをコードする全長cDNA、及びトランスフェクトされた哺乳類細胞でのその発現を記載する。例6はB N K細胞及び293細胞中での活性化されたプロテインCの生産を記載する。例7は変形された開裂部位を有するブレカースーからのプロテインCの製造を記載する。例8はトランスフェクトされた細胞からのプロテインCの分泌を指令するファクターVIIブレイブペプチド又はプロトロンビンブレイブペプチドの使用を記載する。

例

制限エンドヌクレアーゼ、及び他のDNA修飾酵素（例えば、T4ポリヌクレオチドキナーゼ、ウシアルカリ性ホスファターゼ、Klenow DNAポリメラーゼ、T4ポリヌクレオチドリガーゼ）はベセスダ・リサーチ・ラドラトリース（BRL）及びニュー・イングランド・ビオラプスから得られ、そして特にことわらない限り製造者の指示に従って使用した。

シウム勾配上でのバンド化により、陽性クローンからフェージを調製した。EcoRIを用いてcDNA挿入部を取り出し、そしてプラスミドpUC9（Vieira及びMessing, Gene 19: 259-268, 1982）にサブクローニングした。制限断片をフェージベクターM13mp10及びM13mp11（Messing, Meth. in Enzymology 101: 20-77, 1983）にサブクローニングし、そしてジデオキシ法（Sanger等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467, 1977）により配列決定した。ヒトプロテインCの既知の部分配列（Kisiel、前掲）に対応しそして軽鎖のアミノ酸64から始まりそして重鎖を通過して3'-非コード領域に伸びるプロテインCをコードするDNAを含有する1個のクローンを選択した。このクローンをλHC1375と命名した。アミノ酸24からのプロテインCをコードする第二のcDNAクローンを同定した。このクローンからの挿入部をpUC9にサブクローニングし、そしてこのプラスミドをpHCλ6L（第1図）と称した。このクローンは、重鎖コード領域、終止コドン及び3'非コ

オリゴヌクレオチドはアプライド・バイオシステムス・モデル380A DNA合成機により合成し、そして変性ゲル上でのポリアクリルアミドゲル電気泳動により精製することができる。E. コリ（E. coli）の細胞はManiatis等（Molecular Cloning: A Laboratory Manual、コールドスプリング・ハーバー・ラボラトリー、1982）に記載されているようにして形質転換することができる。M13及びpUCクローニングベクター並びに宿主株はBRLから入手した。

例1. ヒトプロテインCをコードするDNA配列のクローニング

ヒトプロテインCの一部分をコードするcDNAを、Foster及びDavie（前掲）により記載されている様にして調製した。要約すれば、常法に従ってヒト肝臓mRNAからλgt11 cDNAライブラリーを調製した。ヒトプロテインCに対する、アフィニティー精製され¹²⁵I-ラベル化された抗体を用いてクローンをスクリーニングし、そしてプレート溶解法²（Maniatis等、前掲）及びこれに続く塩化セ

ード領域を含むプロテインCの大部分をコードしている。

λHC1375からのcDNA挿入部をα³²PdNTPを用いてニックトランスレーションし、そしてWoo（Meth. in Enzymology 68: 381-395, 1979）により改変されたBenton及びDavis（Science 196: 181-182, 1977）のブランクハイブリダイゼーション法を用いてフェージλシャロン4A（Maniatis等、Cell 15: 687-702, 1978）中のヒトゲノムライブラリーをプローブするために使用した。陽性クローンを単離し、そしてブランク精製した（Foster等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 4673-4677, 1985、引用によりこの明細書に組み入れる）。陽性クローンから調製したフェージDNA（Silhavy等、Experiments with Gene Fusion、Cold Spring Harbor Laboratory, 1984）をEcoRI又はBgl IIにより消化し、そしてゲノム性挿入部を精製しそしてpUC9にサブクローニングした。挿入部の制限断片をM13ベクターにサブクローニングし、そして配列決定することによりそれらの

同一性を確認しそして完全な遺伝子のDNA配列を確立した。

pHC λ 6LのcDNA挿入部をニックトランスレーションし、そしてファージ λ シャロン4Aライブラリーをプローブするために用いた。このcDNAの5'末端及び3'末端から作られたプローブにハイブリダイズする1個のゲノム性クローンが同定された。このファージクローンをEcoRIにより消化し、そしてプロテインC遺伝子の5'末端に対応する4.4 kb断片をpUC9にサブクローニングした。得られる組換プラスミドをpHCR 4.4と命名した。完全なDNA配列分析により、pHCR 4.4中の挿入部が1263bpのイントロンにより分離された70塩基対及び167塩基対の2個のエクソンを含むことが示された。第一エクソンはアミノ酸-42~-17をコードし、そして第二エクソンはアミノ酸-19~-37をコードする。配列分析により完全なプロテインC遺伝子のDNA配列が確保された。

前記のように、ゲノム性クローンを使用してこの発明において使用するための許容されるコード

配列を造成するためには、次にイントロンを除去する必要がある。

例2. プロテインCのための全長コード配列の造成

ブレイクプロベチドを含むプロテインCのための全長コード配列は適切なcDNA断片とゲノム性クローンを連結することにより造成される。これは、ゲノム性クローン(pHCR 4.4)からイントロンを除去し、そして融合されこエクソンを便利な制限部位においてcDNA(pHC λ 6Lから)に連結することにより達成される。所望のゲノムDNA:cDNA連結部は、オリゴヌクレオチド指令除去変異誘発により不所望の配列をプールアウトすることにより生じさせる。

プラスミド pHC λ 6Lは、pUC9のEcoRI部位にクローニングされたプロテインCの部分的cDNAを含有する。このcDNA挿入部を2個の断片としてサブクローニングしてゲノム性クローンの最も5'側のコード領域に連結するために用意する。プラスミド pHC λ 6LをEcoRI及びSal Iにより消化し、

そして反応混合物をフェノール及びCHCl₃により抽出し、そしてエタノール沈澱せしめる。得られるDNA断片を連結緩衝液中に再懸濁し、そしてT4DNAリガーゼを加える。この連結混合物を15℃にて14時間インキュベートする。この連結混合物のアリコートを使用して、E. コリJM83を形質転換し、そして細胞をX-galを含有するLB寒天上にプレートする。白色コロニーを選択し、そしてプラスミドDNAを調製する。DNAを制限酵素消化により分析することによりcDNAの3'部分(約1450bpの挿入部)を含有するクローン、及びcDNAの5'部分(約65bpの挿入部)を含有するクローンを同定する。これらのクローンをそれぞれp9C3'及びp9C5'と命名する(第6図)。

このcDNAから欠けている5'コード領域はゲノム性クローンpHCR 4.4のエクソンI及びII中に含まれている。このプラスミドは約4400bpの挿入部を含有し、そしてイントロンB中に位置するEcoRI部位におけるその3'末端において終る。

pHCR 4.4からコード配列を取り出すため、プラスミドをPst I及びEcoRIで消化し、そして生ずる断片をアガロースゲル中での電気泳動により分離する。エクソンI及びIIを含有する約2540bpの断片をゲルから単離し、そしてCTABにより抽出する(Langridge等、*Analyt. Biochem.* 103:264, 1980)。5'P-Rと称するこの断片をpUC9にサブクローニングしてプラスミドp5'P-Rを生成せしめる(第7図)。

p5'P-R中のイントロン(イントロンAと称する)を2段階法により除去する(第7図)。プラスミドをApa Iで消化する。Apa Iはイントロン中のユニーク部位で開裂せしめそして3'オーバーハング末端を残す。次に、線状化されたプラスミドをBal 31エキソヌクレアーゼ又はT4ポリメラーゼにより処理して各末端から約400bpを除去し、そして生ずる断片をS1ヌクレアーゼにより平滑末端化する。線状化されたプラスミドをリガーゼにより再環化し、そしてこれを用いてE. コリJM83を形質転換する。プラスミドDNAを抽出

し、そしてイントロンA中のSma I及びSst I制限部位の存在について分析し、そして300~400bpに短縮されたSma I-Sst I断片を有するプラスミドを選択し、そしてp5' PΔaRと命名する。

イントロンAの残りを、2-プライマー法についてZoller及びSmith (Manual for Advanced Techniques in Molecular Cloning Course, コールスプリングハーバーラボラトリー、1983)により記載されているのと実質的に同じオリゴヌクレオチド-指令除去変異誘発により除去する。p5' PΔaRをPst I及びEcoR Iで消化し、そしてプロテインC断片を、Pst IとEcoR Iで消化したM13mp9にサブクロニングする。正鎖ファージDNAを鋳型として調製し、そしてオリゴヌクレオチドmut-1 (第1表)にアニールする。この変異原オリゴヌクレオチドは、連結されるべきエクソンI及びIIの配列に対して相補的な配列を含有する。M13ユニバーサル配列決定用プライマーを同じ鋳型上のmut-1の3'側にアニールする。これらのプライマーをDNAポリメラーゼI

(Klenow断片)及びヌクレオシドトリホスフェートを用いてT4DNAリガーゼの存在下で延長せしめる。生ずるデュプレックスDNA環をE. コリJM103に形質転換し、そして生ずるブランクをストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で³²P-ラベル化変異原オリゴヌクレオチドをプローブとして用いてスクリーニングする。陽性ブランクからのDNAを単離し、そしてオリゴヌクレオチドプライマーI (第1表)を用いてスクリーニングする。このプライマーはエクソンIIにおいてプライムし、除去連結部を含むDNA配列の決定を可能にする。エクソンI及びIIの正しいインフレーム融合を有する分子を選択する。

M13複製形から、制限エンドヌクレアーゼ消化及びアガロースゲル電気泳動によりPst I-EcoR I断片を単離し、そしてこれをpUC9にサブクロニングしてプラスミドp5' I-IIを生成せしめる (第7図)。

第8図に関し、5'コード領域をcDNAに連結するため、前記プラスミドのPst I及びEcoR Iによ

り消化によって約1277bpのPst I-EcoR I断片を単離し、そしてアガロース電気泳動により精製する。p9C5'をSal I及びEcoR Iで消化することにより65bpの最も5'側のcDNA断片を単離し、そしてアクリルマミドゲル上での電気泳動により精製する。2個の断片をそれらのEcoR I末端において連結し、そして得られた約1330bpのPst I-Sal I断片を、Pst I及びSal Iで消化したM13mp9にサブクロニングする (第8図)。正鎖ファージDNAをオリゴヌクレオチド指令除去変異誘発のための鋳型として調製する。オリゴヌクレオチドmut-2 (第1表)をこの鋳型にアニールし、そしてオリゴヌクレオチドmut-3 (第1表)を第二プライマーとして上流にアニールする。これらのプライマーを前記のようにして延長する。オリゴヌクレオチドmut-2はアミノ酸23-26をコードするエクソンII配列のcDNAへのコドン27における融合を指令する。第二プライマー (mut-3)は翻訳開始部から35bp上流にEcoR I部位を導入する。生ずるファージを、NC0 I部位及びXba I

部位の不存在並びに導入されたEcoR I部位の存在についてスクリーニングする。所望の制限パターンを示すファージDNAを、プライマー-2 (第2表)を用いて配列決定することによりエクソンIIとcDNAとの間の正しい連結部の存在を確認する。正しい配列を有するファージDNAを選択し、そして5'コード領域を含むPst I-Sal I断片をM13組換えファージの複製形から単離する。この断片をアガロースゲル電気泳動により精製し、そしてPst IとSal Iで消化したpUC9に挿入してプラスミドpC5' endを生成せしめる。

第9図に関し、プラスミドpC5' endをEcoR I及びSal Iで消化し、そして5'プロテインC断片をアガロースゲル電気泳動により精製し、そしてCTABにより抽出する。cDNAの残りを、p9C3'からSal I-EcoR I断片として単離する。2個の断片を三元連結により、EcoR Iで消化したpUC9に連結する。連結混合物を用いてE. コリJM83を形質転換し、細胞をLB+X-gal上にプレートし、そして白色コロニーからプラスミドDNAを単離す

る。得られたプラスミドをpMMCと命名する。このプラスミドは約1500bpのEcoRI断片上にヒトプロテインCの完全なコード配列を含有する。

第1表

オリゴヌクレオチド	配 列
mut-1	3'CGA CGA GAA CTG AGT CAC AA5'
mut-2	3'CTG AAG CTC CTC CGG TTC CTT TAA5'
mut-3	5'GGA GGA ATT CTG AGC3'
primer-1	5'TTT GCG GAT CCG CAG3'
primer-2	5'CGA CGT GCT TGG ACC3'

例3. プロテインCのための発現ベクターの造成

プロテインCをコードする挿入部をpMMCからEcoRI断片として取り出し、そして適当な哺乳類細胞発現ベクターに挿入する。ベクターの例としてpD7が挙げられ、このものはSV40エンハンサー並びにアデノウイルス2主要後期プロモーター及び三分節 (tripartite) リーダーを含んで成る。プラスミドpD7はプラスミドpDHFR III (Berkner

及びSharp, Nuc. Acids Res. 13 : 841-857, 1985)に由来する。pDHFR III中のDHFR配列のすぐ上流のPst I部位をBcl I部位に転換する。これは次の様にして行う。10 μ gのプラスミドを5ユニットのPst Iにより37℃にて10分間100 μ lの緩衝液A (10mM Tris、pH 8、10mM MgCl₂、6mM NaCl、7mM β -MSH) 中で消化した。DNAをフェノール抽出し、エタノール沈澱せしめ、そして10mM dCTP及び16ユニットのT4DNAポリメラーゼを含有する緩衝液B (50mM Tris、pH 8、7mM MgCl₂、7mM β -MSH) 40 μ l中に再懸濁し、そして12℃にて60分間インキュベートする。エタノール沈澱の後、400ユニットのT4ポリヌクレオチドリガーゼを含有する緩衝液C (10mM Tris、pH 8、10mM MgCl₂、1mM DTT、1.4mM ATP) 14 μ l中でDNAを2.5 μ gのキナーゼ処理Bcl Iリンカーに12℃にて12時間連結せしめた。フェノール抽出及びエタノール沈澱の後、DNAを120 μ lの緩衝液D (75mM KCl、6mM Tris、pH 7.5、10mM MgCl₂、1mM DTT) に再懸

濁し、80ユニットのBcl Iにより50℃にて60分間消化し、そしてアガロース中で電気泳動した。フォームIIIプラスミドDNA (10 μ g) をゲルから単離し、そして50ユニットのポリヌクレオチドリガーゼを含有する10 μ lの緩衝液C中で12℃にて2時間連結せしめ、そしてこれを用いてE. コリHB101を形質転換した。迅速DNA調製分析により陽性コロニーを単離し、そして陽性コロニーから調製したプラスミドDNA (pDHFR' と称する) をdAM⁺ E. コリに形質転換した。

次に、プラスミドpD2'を次の様にして調製した。15 μ gのpDHFR'及びpSV40 (BamH I消化されたSV40を含んで成る) を37℃にて60分間インキュベーションすることにより開裂せしめた。DNA断片をアガロースゲル電気泳動により分離し、そして4.9 kbのpDHFR'断片及び0.2 kbのSV40断片を単離した。これらの断片(200ngのpDHFR' DNA及び100ngのSV40 DNA)を、100ユニットのT4ポリヌクレオチドリガーゼを含有

する10 μ lの緩衝液C中で12℃にて4時間インキュベートし、そして生じた造成物 (pD2')を用いてE. コリRR1を形質転換した。

プラスミドpD2'を、pBR322領域中の“毒性”配列を除去することにより変形した (Lusky及びBotchan, Nature 293 : 79-81, 1981)。プラスミドpD2' (6.6 μ g) 及びpML-1 (Lusky及びBotchan, 前掲) を50 μ lの緩衝液A中で10ユニットずつのEcoRI及びNru Iと共に37℃にて2時間インキュベートし、次にアガロースゲル電気泳動にかけた。1.7 kbのpD2'断片及び1.8 kbのpML-1断片を単離し、そして100ユニットのT4ポリヌクレオチドリガーゼを含有する20 μ lの緩衝液C中で12℃にて2時間連結し、そして次これを用いてE. コリHB101を形質転換した。所望の造成物 (pD2と称する) を含有するコロニーを迅速調製分析により同定した。次に、10 μ gのpD2を20ユニットずつのEcoRI及びBgl IIにより50 μ lの緩衝液A中で37℃にて2時間消化した。DNAをアガロース電気泳動し、そして目

的とする、pBR322 3' スプライス部位及びポリ A 配列を含有する 2.8 kb 断片 (断片 C) を単離した。

pD3 の造成において使用される残りの断片を得るため、pDHFR III を変形して Sac II (Sst II) 部位を Hind III 部位又は Kpn I 部位のいずれかに転換した。10 μ g の pDHFR III を 20 ユニットの Sst II により 37℃ にて 2 時間消化し、次にフェノール抽出及びエタノール沈殿を行った。再懸濁された DNA を、10 mM dCTP 及び 16 ユニットの T4DNA ポリメラーゼを含有する 100 μ l の緩衝液 B 中で 12℃ にて 60 分間インキュベートし、フェノール抽出し、透析し、そしてエタノール沈殿した。DNA (5 μ g) を、400 ユニットの T4DNA リガーゼを含有する 20 μ l の緩衝液 C 中で、キナーゼ処理された Hind III 又は Kpn I エリンカー 50 mg と 12℃ にて 10 時間連結し、フェノール抽出し、そしてエタノール沈殿した。50 μ l の緩衝液 A に再懸濁した後、生ずるプラスミドを、適当であれば 50 ユニットの Hind III 又は Kpn I により消化し、そしてアガロース電気泳動した。ゲル単離された

DNA (250mg) を、400 ユニットの T4DNA リガーゼを含有する 30 ml の緩衝液 C 中で 12℃ にて 4 時間連結し、そしてこれを用いて E. コリ RRI を形質転換した。生ずるプラスミドを pDHFR III (Hind III) 及び pDHFR III (Kpn I) と命名した。次に、pDHFR III (Kpn I) から Bgl II 及び Kpn I による消化並びにこれに続くアガロースゲル電気泳動により 700bp の Kpn I - Bgl I 断片 (断片 A) を精製した。

SV40 エンハンサー配列を次の様にして pDHFR III (Hind III) に挿入した。50 μ g の SV40 DNA を 120 μ l の緩衝液 A 中で 50 ユニットの Hind III と共に 37℃ にて 2 時間インキュベートし、そして Hind III C SV40 断片 (5089-968 pb) をゲル精製した。プラスミド pDHFR III (Hind III) (10 μ g) を 250ng のウシ腸ホスファターゼにより 37℃ にて 1 時間処理し、フェノール抽出し、そしてエタノール沈殿せしめた。線状化されたプラスミド (50 ng) を、200 ユニットの T4 ポリヌクレオチドリガーゼを用いて 16 μ l の緩衝液 C 中で

12℃ にて 3 時間、250ng の Hind III C SV40 と連結し、そして E. コリ HB101 に形質転換した。次に、このプラスミドから 700bp の EcoRI - Kpn I 断片 (断片 B) を単離した。

pD3 の最終的造成のため、断片 A 及び B (50ng ずつ) を、200 ユニットの T4 ポリヌクレオチドリガーゼを用いて 12℃ にて 4 時間、10ng の断片 C と連結し、そして次に E. コリ RRI の形質転換を行った。陽性クローンを迅速調製法により検出し、そして pDS の大量調製を行った。

Bcl I 制限部位を EcoRI 部位に転換することによってプロテイン C 配列の挿入を受け入れるようにプラスミド pD3 を変形する。まず、常用のリンカー付加法によって EcoRI を BamHI に転換することにより、アデノウイルス 5' - 0-1 マップユニットの最左端において pD3 中に存在する EcoRI 部位を除去する必要がある。要約すれば、プラスミドを EcoRI で消化し、そして線状化された DNA を T4DNA ポリメラーゼ及び 4 種類すべてのデオキシヌクレオチドリホスフェートにより処理する

ことにより平滑末端を生じさせる。次に、プラスミドを BamHI 制限部位を含むオクタヌクレオチドに連結し、この DNA を BamHI で消化して過剰のリンカーを除去し、そして哺乳類細胞発現配列を含有する断片を pML-1 の BamHI 部位にクローン化する。生ずるプラスミドを E. コリ HB101 にトランスフェクし、そしてプラスミド DNA を調製し、そして正しい変更についてスクリーニングする。同様にして、Bcl I 部位を、オクタヌクレオチドリリンカーを用いて EcoRI 部位に転換する。得られるベクターは pD7 として知られる。次に、pMMC からの 1.5 kb プロテイン C EcoRI 断片を pD7 の EcoRI 部位に挿入して発現ベクター pD7C (第 10 図) を生成せしめる。

プロテイン C 配列の発現が可能なベクターをポリシストロン メッセージから pD5 を使用することにより造成する。pD5 は pD3 に類似しており、5' - 非コード領域のほとんどが欠けており DHFR コード配列を含有する。DHFR 配列をさらに変形してメトトレキセートに対するその結合親和性を低

下せしめる。

pD3について記載したのと同様にしてベクターpD5を造成する。但し、BamHI部位が異種性DNAの挿入部位であり、そしてSV40ポリアデニレーションシグナルを含有するBamI-BamIII SV40断片が後の方向にある点においてpD5はpD3と異なる。

DHFR配列を変形するまでpDHFR IIIをPst I及びScl Iにより消化し、そして400bpのDHFR断片を単離する。これをM13ファージベクターにサブクローニングし、そしてSimonson及びLevinson (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2495-2499, 1983)により記載されたようにして変量せしめる。この変量はDHFR配列中の1塩基対の変化をもたらす。次に、変形された断片をpDHFR IIIに再挿入してプラスミドpDHFR^r IIIを生成せしめる。

次に、DHFR配列の5'非コード領域を除去する。プラスミドpDHFR^r IIIをFnu4HI (これはプラスミドを約20個の部位で切断する)で開裂せしめ、次にT4DNAポリメラーゼ及び4種類すべての

デオキシヌクレオチドトリホスフェートで処理して平滑末端を生じさせる。この末端にBamHIリンカーを連結し、そしてこの混合物をBamHI及びNco Iにより消化する。DHFR^r cDNAを含む0.6 kbのBamHI-Nco I断片が単離される。プラスミドpDHFR IIIをNco I及びBamHIで消化し、そしてSV40ポリアデニレーションシグナルを含む0.2 kb断片を単離する。前方向にあるポリアデニレーションシグナルを次にDHFR^r断片に連結する。BamHIで消化した後、生ずるBamHI断片をpD5のBamHI部位に挿入し、そしてこの連結混合物を用いてE. コリHB101を形質転換する。プラスミドDNAを調製し、そして制限エンドヌクレアーゼ消化によりスクリーニングする。Ad2主要後期プロモーターからの転写のために正しい方向にDHFR^r挿入部を有するプラスミドをpD5 (DHFR^r)と命名する。

プラスミドpD5 (DHFR^r)を用いてプロテインCを発現せしめるため、pMMCをEcoRIで消化し、そして1.5 kbプロテインC断片を単離する。EcoR

I末端をリンカー付加によりBcl I末端に転換する。プラスミドpD5 (DHFR^r)をBamHIで部分消化することにより、これをDHFR^r配列5'末端において開裂せしめ、そしてプロテインC断片に連結する。プラスミドDNAを適切な方向及びプロテインC断片の挿入についてスクリーニングする。pD5 (PC-DHFR^r)と称する得られたベクターを第11図に示す。

例4. トランスフェクトされた哺乳類細胞でのプロテインCの発現

子ハムスター腎 (BHK) 細胞 (ATCC CCL10) をpD7Cを用いてリン酸カルシウム同時沈殿によりトランスフェクトする (Wigler 等、Cell 14: 725, 1978; Corsaro 及び Pearson, Somatic Cell Genetics 7: 603, 1981; 並びに Graham 及び Van der Eb, Virology 52: 456, 1973)。細胞を37℃、5%CO₂にてダルベコ培地 (10%の熱不活性化ウシ胎児血清を添加し、そしてL-グルタミン及びペニシリン-ストレプトマイシンを補充したもの) 中、60mmの組織培養ベトリ血

中で20%のコンコルエンシーまで増殖せしめる。合計10μgのDNAを用いて1枚の60mm皿をトランスフェクトする: 3.75μgのpD7C、1.25μgのpK0-neo (Southern 及び Berg, J. Mol. Appl. Genet 1: 327-341, 1982) 及び5μgのサケ精子DNA。DNAを0.3M NaOAc、75%エタノール中で沈殿せしめ、70%エタノールで洗浄し、そして20μlの10mM Tris-HCl (pH 8)、1mM EDTA中に再溶解する。DNAを440μlの水、及び500μlの280mM NaCl、1.5mM NaHPO₄、12mMデキストロース、50mM HEPES (pH 7.12)と混合する。上記の混合物に60μlの250mM CaCl₂を滴加し、そしてこの溶液を室温にて30分間放置する。次にこの溶液を細胞に加え、そして細胞37℃にもどして4時間置く。培地を除去し、そして血清を含むダルベコ培地中20% DMSOを5ml室温にて2分間にわたって加える。次に血を培地により2回迅速に洗浄し、そして新鮮な培地中で一夜インキュベートする。DNAを添加して24時間後、培地を除去し、そして選択培

地（血清を含有するダルベコ培地中 10 mg/ml の G418、 $498 \text{ } \mu\text{g/ml}$ のジブコ）を加える。約10～13 日間の後、pK0-neo 遺伝子を取り込みそしてそれ故にG418に対して耐性である細胞を代表する個々のクローンを96-ウエルプレートに移し、そして10%ウシ胎児血清を含有するダルベコ培地中で蛋白質アッセイのために増殖せしめる。

プロテインCを測定するため、培地を遠心分離によって細胞及び細胞片から分離し、そしてプロテインCポリペプチド及び生物学的活性についてアッセイする。トリブシンにより細胞をプレートから離し、新鮮な培地で洗浄し、遠心し、そして -20°C にて凍結する。測定のため、細胞ペレットをPBS中で解凍し、ペレット化し、そして0.25%トリトンX-100を含有するPBS中に再懸濁する。サンプルを攪拌し、そしてポリペプチド及び活性についてアッセイする。

プロテインCのためのエンザイム-リンクド・イムノソルベンド・アッセイ(ELISA)を次の様に行う。ヒトプロテインCに対する、アフィニ

ティ精製した抗体($100 \text{ } \mu\text{l}$ の $0.1 \text{ M Na}_2\text{CO}_3$, pH 9.6、中 $1 \text{ } \mu\text{g/ml}$) を96-ウエルマイクロタイタープレートの各ウエルに加え、そしてプレートを4℃にて一夜インキュベートする。次に、ウエルを3回、0.05%トウイーン20を含有するPBS (5 mM リン酸緩衝液、pH 7.5、 0.15 M NaCl) で洗浄し、そして次にPBS中1%ウシ血清アルブミン、0.05%トウイーン20を $100 \text{ } \mu\text{l}$ と共に4℃にて一夜インキュベートする。次にプレートをPBSにより数回すすぎ、空気乾燥し、そして4℃にて貯蔵する。サンプルを測定するため、 $100 \text{ } \mu\text{l}$ の各サンプルを、コートされたウエル中で37℃にて1時間インキュベートしそしてウエルをPBS中0.05%トウイーン20ですすぐ。次に、プレートを、1%ウシ血清アルブミン及び0.05%トウイーン20を含有するPBS中、プロテインCに対するビオチン-接合ヒツジポリクローナル抗体 (30 ng/ml) と共に37℃にて1時間インキュベートする。ウエルをPBSですすぎ、そして1%ウシ血清アルブミン及び0.05%トウイーン20

を含有するPBS中アルカリ性ホスファターゼに接合したアビジンと共に37℃にて1時間、再度インキュベートする。次に、ウエルをPBSですすぎ、そして 0.3 mM MgCl_2 を含有する10%ジエタノールアミン (pH 9.8) 中ホスファターゼ基質 (シグマ104:600 $\mu\text{g/ml}$) $100 \text{ } \mu\text{l}$ の添加によりアルカリ性ホスファターゼ活性を測定する。 405 nm での吸光をマイクロタイタープレートリーダー上で読み取る。

例5Cにおいて記載する活性化後に血漿のカオリン-ケファリン凝固時間を延長するその能力によりプロテインCの生物学的活性を測定する。

例5. プロテインCをコードする全長cDNAの発現

A. cDNAの単離

プロテインCのブレーブローペプチドのアミノ酸-42~-19に対応するエクソン (第4図においてエクソン1) を含有するゲノム断片を単離し、ニックトランスレートし、そしてこれをプローブとして用いて、Gubler及びHoffman (Gene 25:263-

269, 1983)の技法によりHEPG2細胞からのmRNAを用いて造成されたcDNAライブラリーをスクリーニングした。このセルラインはヒト肝細胞に由来し、そしてすでに示されているようにプロテインCを合成する (Fair及びBahnak, Blood 64:194-204, 1984)。ファージ λ gt11のEcoRI部位に挿入されている。cDNAを含有する陽性クローンを単離し、そしてプロテインC遺伝子の5'非コード領域に対応するオリゴヌクレオチドプローブによりスクリーニングした。1個のクローンがこのプローブによっても陽性であり、そしてその全ヌクレオチド配列を決定した。このcDNAは70bpの5'-非翻訳配列、ヒトブレーブロープロテインCの完全なコード配列、及び第二ポリアデニレーション部位に対応する完全な3'-非コード領域を含有していた (第2図)。

B. 発現ベクターの造成

プロテインC cDNAの発現をベクターpDX中で達成した。このベクターはpD3 (例3において記載した) 及びpD3'から誘導された。pD3'ベク

ターはpD3と同じであるが、但しSV40ポリアデニレーションシグナル(すなわちSV40 BamHI (2533bp) - Bcl I (2770bp) 断片が後方向にある点において異なる。すなわち、pD3'は遺伝子挿入部としてBamHI部位を含有する。

pDXを得るため、pD3'をEcoRIで開裂せしめ、SIスクレアーゼと共にインキュベートし、そして次にBalIリンカーに連結することにより、pD3'中のEcoRI部位をBcl I部位に転換した。陽性と同定されたコロニーからDNAを調製し、そして変化した制限部位を含有する1.9 kbのXho I-Pst I断片をアガロースゲル電気泳動により調製した。第二の変形において、pD3'をキナーゼ処理されたEcoRI-BalIアダプター(オリゴヌクレオチドZC525: 5' GGAATTCT 3'; 及びZC526: 5' GATCAGAATTC 3'から造成)に連結して、発現ベクターに遺伝子を挿入するための位置としてEcoRI部位を生じさせた。制限エンドヌクレアーゼ分析により陽性クローンを同定し、そしてこのクローンからのDNAを用いて変形された制限部

位を含有する2.3 kbのXho I-Pst I断片を単離した。上記の2個の断片をT4DNAリガーゼと共にインキュベートし、E. コリHB101を形質転換し、そして陽性コロニーを制限分析により同定した。このプラスミドは外来遺伝子を挿入するためのユニークEcoRI部位を含有する。

次に、プロテインCのcDNAをEcoRI断片としてpDXに挿入した。組換プラスミドを制限分析によりスクリーニングして、プロモーター要素に対して正しい方向にプロテインC挿入部を有するプラスミドを同定し、そして正しいクローンからプラスミドDNA(pDX/PCと称する)を調製した(第12図)。pDX/PC中のcDNA挿入部は5'非コード領域にATGコドンを含む(第2図を参照のこと)ため、トランスフェクション及び発現実験に先立ってcDNA上に除去変異を行った。オリゴヌクレオチド指令変異誘発の標準的方法に従って3塩基対の除去を行った。変形されたcDNAを含有するpDXを基礎とするベクターをp594と称する。

以下余白

C. cDNAの発現

プラスミドp594をリン酸カルシウム沈殿法によりCOS-1(ATCC CRL 1650)細胞、BHK細胞、及び293細胞にトランスフェクトした。4時間後、新鮮な培地(5 μ g/mlのビタミンKを補充したもの)を加えた。適当な時点(通常48時間又は72時間)で培地を収得し、そして細胞を集めそして細胞を溶解した。

cDNAクローンの最初の同定に使用したのと同じアフィニティー精製されたポリクローナル抗体を用いるELISAにより、培地中に分泌されたプロテインCを測定した。COS-1細胞のアッセイも作った。

組換蛋白質の γ -カルボキシル化の程度を測定するため、培地のサンプルをクエン酸バリウム沈殿にかけた。この方法は γ -カルボキシル化蛋白質のみを血漿から選択的に沈殿せしめる方法である(Bajaj等、J. Biol. Chem. 256: 253-259, 1981)。プロテインC抗原性物質の70%以上がクエン酸バリウムにより沈殿した。

組換プロテインCを、凝固を長びかせるその能力を測定することにより抗凝固活性について測定した。透析された培地サンプルをプロタック(Protac)C(アメリカンダイアグノスチカ)で処理することによりプロテインCを活性化した。次に、サンプルをインビトロ凝固アッセイ(Sugo等、J. Biol. Chem. 260: 10453, 1985)に加えた。要約すれば、50 μ lずつの正常血のヒト血漿、ラビット脳ケファリン(TBS(50mM Tris, pH7.5, 150mM NaCl)中10mg/ml)、及びカオリン懸濁液(TBS中5mg/ml)をシリコン処理ガラスチューブ中で混合した。37℃にて2分間のブレインキュベートの後、TBS中に収容された100 μ lの活性化されたプロテインCを加え、そしてインキュベーションを37℃にてさらに2分間続けた。次に、50 μ lの2.5mM CaCl₂を添加することにより凝固を開始し、そして凝固時間を記録した。組換物質の活性は天然プロテインCのそれと本質的に同じであることが示された。

トランスフェクトされたBHK細胞及び293細胞

胞により生産されたプロテインCをウエスタンブロッティングによりさらに分析した。培地サンプルを変性ゲル上で電気泳動し、そしてプロットを調製し、そしてプロテインCに対する放射性ラベル化抗体によりプローブした。その結果、BHK細胞からのプロテインCの約20%が二本鎖形であり、他方293細胞からのプロテインCの約90%が二本鎖形であった。

第2表

COS-1細胞及び293細胞におけるプロテインCの一時的(transient)発現及び分泌

細胞	プラスミド	培地中の プロテインC (ng/ml)
COS-1	無し	0
COS-1	p594	10
293	無し	0
293	p594	50

よりSst I断片の正しい方向についてスクリーニングした。正しいプラスミドを選択し、そしてpPC829と命名した。プラスミドpPC829を配列決定して目的とするコード配列の存在を確認した。

プラスミドpPC829をBHK細胞に(プラスミドpSVdHFR (Lee等、Nature 294: 228-232, 1981)と共に)、又は293細胞に(pKO-neo (Southern及びBerg, J. Mol. Appl. Genet. 1: 327-341, 1982)と共に)、リン酸カルシウム同時沈殿法(Graham及びvan der Eb, Virology 52: 456-467, 1973)により同時トランスフェクト(co-transfect)した。48時間後、培地を収得し、そしてELISAによりプロテインCについてアッセイした。結果を第3表に示す。選択培地の存在下で10日後、安定にトランスフェクトされたコロニーをプロテインCの生産についてイムノフィルターアッセイ(McCracken及びBrown, Bio Techniques, 82-87, 1984年3月/4月)によりスクリーニングした。プレートをPBS又は非血清培地(ダルベコ培地+ペニシリン-ストレプトマイシン、

例6. 活性化されたプロテインCの発現

プロテインCのcDNAを部位特定変異誘発により変更して活性化ペプチドをコードする部位を除去した。次に、変形された配列をBHK細胞及び293細胞にトランスフェクトし、そして安定にトランスフェクトされた細胞を選択した。両セルラインからの培地サンプル中の活性プロテインCを検出した。

活性化ペプチドコード配列を除去するため、プラスミドp594をSst Iで消化し、そして約880bpの断片を精製し、そしてM13mp10のSst I部位に挿入した。12個の活性化ペプチドコドン、変異原オリゴヌクレオチド5' CTGAAACGACTCATTGAT 3'を用いてオリゴヌクレオチド指令除去変異誘発(Zoller等Smith, DNA 3: 479-488, 1984)により除去した。変異ファージクローンから複製形DNAを調製し、そしてSst Iにより消化した。プロテインC断片(約840bp)を単離し、そしてSst Iで消化されたp594に挿入した。生ずるプラスミドを、Bgl IIを用いる制限酵素マッピングに

5 µg/mlビタミンK)ですすいた。次に、テフロン網を細胞上に置いた。ニトロセルロースフィルターを、適当であればPBS又は非血清培地で湿し、そして前記の網の上に置いた。37℃にて4時間のインキュベーションの後、フィルターをはずし、そして緩衝液A (50mM Tris, pH7.4, 5mM EDTA, 0.05% NP-40, 150mM NaCl、0.25%ゼラチン)中に室温にて30分間置いた。フィルターを室温にて1時間、振とうしながら、緩衝液A中プロテインCに対するビオチン-ラベル化ヒツジポリクローナル抗体(1 µg/ml)でインキュベートした。次に、フィルターを緩衝液A中で洗浄し、そして室温にて1時間振とうしながら、緩衝液A中アビジン接合西洋ワサビパーオキシダーゼ(ベーリンガー-マンハイム)(1:1000)中でインキュベートした。フィルターを緩衝液B中で、次に水中で洗浄し、そして発色試薬(100mlの50mM Tris, pH7.4, 150mM NaCl中60mg HRP発色試薬(ビオラッド)、20mlメタノール、100 µl H₂O₂)中でインキュベートした。フィルターを水

第3表

活性化されたプロテインCの一時的発現 (ELISA)

セルライン	培地中のプロテインC (ng./ml)
BHK	2.7
293	30

例7. プロテインCプロセシング部位の変形

A. 部位特定変異誘発

単鎖プロテインCの二本鎖プロテインC形へのプロセシングを増強するため、蛋白質に2個の追加のアルギニン残基を導入して4個の塩基性アミノ酸から成る開裂部位を形成せしめた。プロテインCの得られた変異体前駆体をPC962と称する。このものは開裂部位に配列Ser-His-Leu-Arg-Arg-Lys-Arg-Aspを含有する。Arg-Asp結合でのプロセシングが二本鎖プロテインC分子をもたらす。

変異系オリゴヌクレオチドZC962 (5' AGTCAC CTGAGAAGAAAACGAGACA 3')を用いる部位特定変異誘発(Zoller 及びSmith, DNA 3: 479-488,

中に移すことにより反応を停止した。

陽性コロニーを拾い上げ、そして選択培地(適当であれば500 μ g/ml G418又は250nM メトトレキセートを含有する)を10日間増殖せしめた。培地を発色アッセイによりAPC活性についてアッセイした。50mM Tris, pH 7.5, 150mM NaCl 中0.2mM スペクトロチーム(Spectrozyme) PGa(アメリカンダイアグノスチカ#336)100 μ lを収容するマイクロタイターウエルに培地サンプルを加えた。プレートに37℃にてインキュベートし、そして種々の時間間隔においてA₄₀₅を測定した。1つのトランスフェクトされた293セルライン(829-20と称する)からの代表的な結果を第13図に示す。セルライン829-10の陽性コロニーからの培地は、同じ時間(10日間)にわたりトランスフェクトされない293細胞と共にインキュベートされた対照培地に比べて、APCのための発色基質を用いて、一貫して高い活性を示した。

以下余白

1984 により2プライマー法について記載されたのと実質的に同じ方法)によりクローン化cDNAを変形することによって変異体分子を生成せしめた。プラスミドp594をSst Iで消化し、そして約87bp断片をM13mp11にクローニングし、そして単鎖鋳型DNAを単離した。変異誘発の後、正しいクローンを配列決定により同定した。複製形DNAを単離し、Sst Iで消化し、そしてプロテインC断片を、Sst Iで切断されたp594に挿入した。所望の方向に挿入されたSst I断片を有するクローンを制限酵素マッピングにより同定した。得られた発現ベクターをpDX/PC962と命名した(第14図)。

B. プロテインCの発現及び特徴付け

プラスミドpDX/PC962をpSV2-DHFR(Subramani 等、Mol. Cell. Biol. 1: 854-864, 1981)と共にリン酸カルシウム法(Graham及びvan der Eb, 前掲、により記載された方法と実質的に同じ方法)によりtk⁻BHK細胞に同時トランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞を、10%ウシ胎児

血清、1 \times PSN抗生物質混合物(ギブコ600-5640)、2.0mM L-グルタミン及びビタミンK (5 μ g/ml)を含有するダルベコの改変イーグル培地(MEM)中で増殖せしめた。細胞を250nM メトトレキセート(MTX)中で14日間選択し、そして得られたコロニーをイムノフィルターアッセイ(例6)によりスクリーニングした。最も強く反応するコロニー6個をシリンドークローニングにより拾い上げ、そして10cmプレート中に個々に増殖せしめた。培養物がコンフルエントに近ずいた時、プロテインCの生産レベルをELISAにより測定した。結果を第4表に示す。

以下余白

第4表

クローン	細胞数 ($\times 10^{-7}$)	ELISA (ng/ml)	pg/細胞/日
962-1	1.1	2500	2.20
-2	0.8	1250	1.56
-3	1.2	1350	1.12
-4	1.2	550	0.46
-5	1.2	1550	1.30
-6	1.2	950	0.80

クローンBHK/962-1を大規模培養で増殖せしめ、そしてヒトプロテインCに対するヒツジポリクローナル抗体7 μ gを2gのCNBr-活性化セファローズ4B（ファルマシア社、ビスカタウェイ、NJ）に連結することにより調製したカラム上でのアフィニティークロマトグラフィーにより数百 μ gのプロテインCを精製した。細胞培養培地をカラムに適用し、このカラムを100mlのTBSで洗浄し、そして3M KSCNを含有するTBSにより又はpH 11.5の緩衝液によりプロテインCを溶出した。ウ

ドリシス活性及び抗-凝固活性の両方を示す形態に活性化され得るその能力についてアッセイした。アフィニティー精製された蛋白質サンプルをTBSに対して十分に透析し、次に0.1容量の1ユニット/mlプロタク（Protac）C（アメリカンダイアグノスティクス）と共に37℃にて1時間インキュベートすることにより活性化した。活性化混合物のアリコートマイクロタイターウエル中の100 μ lの1 μ MプロテインC基質（スペクトロチームPCa、アメリカンダイアグノスティクス）に加え、そしてA₄₀₅の変化を経時的にマイクロタイタープレートリーダーを用いて測定することにより、アミドリシス活性を測定した。活性化されたプロテインCの抗-凝固活性はSugo等（前掲）に記載されているようにして測定した。アフィニティー精製されたPC962は、アミドリシス測定及び抗-凝固測定の両方において十分に活性であることが証明された。pH11.5の緩衝液による抗体カラムからの溶出により、3M KSCN溶出により得られる蛋白質より高い活性を有する蛋白質が得られた。

エスタンプロット分析によれば、天然配列によりトランスフェクトされたBHK細胞から得られたプロテインCの約20%が二本鎖プロテインCであったのに対して、変異体プロテインCは約95%が二本鎖形であった。

PC962変異体蛋白質を発現する安全なBHK細胞クローンから、又は野性型プロテインCを発現する安定な293細胞クローンから、プロテインCのカルシウム-誘導コンフィグレーションに対して特異的なモノクローナル抗体を用いて μ g量のプロテインCを精製した。細胞培養培地を5mM CaCl₂の存在下でカラムに適用し、5mM CaCl₂を含有するTBSでカラムを洗浄し、そして10mM EDTAを含有するTBSによりプロテインCを溶出した。この精製法の使用により、変性条件に暴露することなく完全に活性なプロテインCを精製することが可能であった。精製されたプロテインCをSDS/PAGE及びこれに続く銀染色により分析した。純度が95%より高いことが示された。

BHKにより生産されたPC962蛋白質を、アミ

pDX/PC962をBHK細胞にトランスフェクトすることにより得られるクローン化セルラインを限界希釈法によっても得た。MTXで選択されたコロニーのプレート1枚（約300コロニー）をトリプシン処理し、計数し、そして平均0.5細胞/ウエルでマイクロタイタープレートに再プレートした。これらを250nM MTXを含有する選択培地中で増殖せしめた。約50%のウエルがコロニーを含有していた。同定可能なコロニー（直径1~2mm）を含むウエルを培地中のプロテインCレベルについてELISAによりアッセイした。このアッセイのため、すべてのウエルに新鮮な培地を加え、75分間インキュベートし、次に取り出しそしてアッセイした。75分間で50ng/ml（1000ng/ml/日に相当する）より多くを蓄積する5個のコロニーを、より大規模な培養のために10cmプレートに分けた。これらのクローンのプロテインC生産レベルは1.1~2.8pg/細胞/日であった。

PC962のcDNAをプラスミドZem299に挿入することによりPC962/229と称する第二のプラスミドを

造成した。Zem229はpUC18を基礎とする発現ベクターであって、マウスメタロチオネイン-1プロモーターとSV40転写ターミネーターとの間に外来DNAを挿入するためのユニークBamHI部位を含有する。Zem229はさらに、SV40初期プロモーター、マウスジヒドロフォレートレダクターゼ遺伝子及びSV40ターミネーターを含有する。pDX/PC962からのPC962 cDNAを含有するEcoRI断片を、EcoRI-BamHI合成オリゴヌクレオチドアダプターを用いて、BamHIで切断されそしてホスファターゼで処理されたZem229に連結した。得られるベクターをPC962/229と称し、第14図に示す。

プラスミドPC962/229をリン酸カルシウム法によりBHK細胞にトランスフェクトした。10%ウシ胎児血清及び5 μ g/mlビタミンKを含有するダルベコのMEM中で培養した。このトランスフェクションからの48時間の一時的発現レベルは約25 ng/mlであった。2日後、トランスフェクトされた細胞を250nM MTXを含有する選択培地に分け、そしてさらに14時間培養した。約200

コロニーずつを含有するこのトランスフェクションからの3枚のプレートをイムノフィルターアッセイによってスクリーニングし、そして24個の最も強く反応するコロニーをシリンドークローニングにより拾い上げた。これらを10 cmプレート中で個別に増殖せしめ、そしてこれらのプロテインC生産レベルを測定した。1.1~2.3 pg/細胞/日を生産するコロニーを用いて安定なプロテインC生産セルラインの調製を行った。

発現ベクターpDX/PC962及びプラスミドpK0-neoをリン酸カルシウム法により293細胞に同時トランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞を48時間後に500 μ g/mlのG418を含有する培地に分けた。選択培地中で10日間の後、イムノフィルターアッセイを行いそしてシリンドークローニングにより2個のコロニーを拾った。プロテインC生産は1~2 pg/細胞/日であることが見出された。培養をスケールアップし、そしてプロテインCをイムノアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。プロテインCの95%よ

り多くが二本鎖形であることが見出された。

BHK細胞及び293細胞から調製された962変異体蛋白質の構造を、293細胞から及び血漿からの野性型プロテインCの構造と比較した。SDS/PAGE及びこれに続く銀染色による分析によれば、すべての組換蛋白質が、血漿蛋白質の重鎖及び軽鎖と同時泳動する重鎖及び軽鎖を含有していた。

293細胞中で合成された野性型プロテインCは有意量(約20%)のMr=66,000の単鎖のプロセシングされていない蛋白質を含有しており、他方いずれの細胞型において生産された変異体蛋白質も本質的に完全に二本鎖にプロセシングされていた。N-末端配列分析によれば、組換野性型蛋白質及びBHK/PC962変異体蛋白質の軽鎖及び重鎖の両者は適切にプロセシングされていた。組換蛋白質の γ -カルボキシル化の程度を2つの異なるELISA系により測定した。第一の系は蛋白質の γ -カルボキシル化された形態及びカルボキシル化されていない形態の両者を認識し、他方第二の系は、カルシウムの存在下でgla-誘導コンホーメーシ

ョン変化を受けたプロテインCのみを認識する特異的抗体を用いる。この分析によれば、BHK細胞において生産された組換プロテインCの約60%及び293細胞において生産されたその90~95%が、特異的抗体に認識されるために十分に γ -カルボキシル化されていた。

3種類の組換蛋白質をさらにアミドリシス活性及び抗凝固活性についても分析し、そして結果を血漿プロテインCの活性と比較した。BHK細胞からのPC962及び293細胞からの野性型プロテインCの両者が十分なアミドリシス活性を示した。抗凝固アッセイにおいて、BHK細胞からのプロテインCは血漿プロテインCと本質的に同じ比活性を有し、他方293細胞からの野性型蛋白質及びPC962変異体蛋白質は一貫して約40%高い比活性を示した。

C. 活性化されたプロテインCプロセシング部位の変形

プロセシング部位配列Arg-Arg-Lys-Argを有する活性化されたプロテインC前駆体をコードする

DNA配列を、野性型プロテインC配列の変異誘発により造成した。生ずる配列はpPC829中のそれと類似していたが、しかし活性化ペプチドをコードする部分を欠いていた。

プラスミドp594中に存在するプロテインC配列を1回の変異誘発により変形して活性化ペプチドのコドン除去しそしてプロセシング部位のArg-Argコドン挿入した。変異誘発は、配列5' CGC AGT CAC CTG AGA AGA AAA CGA CTC ATT GAT GGG 3' を有するオリゴヌクレオチドを用いて例7Aに記載したのと実質的に同様にして、p594からの870bp Sst I断片上で行った。

変異した配列を用いて発現ベクターpDX/PC1058を造成し、そしてこのベクターを例7Bに記載したようにしてBHK細胞に同時トランスフェクトした。蛋白質をポリクロナル抗体カラム上でpH11.5の緩衝液を溶離剤として用いて精製した。

1058蛋白質の活性を活性化された血漿プロテインC及び活性化されたPC962と比較した。血漿プロテインC及びPC962 (5 μ g/ml) は1/10容量

のプロタックC (アメリカンダイアグノスチカ) で2時間処理することにより活性化した。50 μ lのヒト血漿を50 μ lの活性化されたプロテインCと混合し、そしてこの混合物を38℃にて150秒間インキュベートすることにより抗凝固活性をアッセイした。この混合物に50 μ lの活性化されたセファロプラスチン (アメリカン・サイエンティフィック・プロダクツ、マクガウバーク、IL) を加え、そしてこの混合物を37℃にて300秒間インキュベートした。100 μ lの20mM CaCl₂を加え、そして凝固時間を記録した。データーを第15図に示す。

例8. プロテインCを分泌せしめるためのファクターVII及びプロトロンビンのブレイプロベプチドの使用

適切にプロセシングされたプロテインCの一層の高収量のため、プロテインCブレイプロベプチドの代わりにファクターVIIブレイプロベプチドを用いた。次に、これらのハイブリッド造成成分を適当な発現ベクターに挿入し、そして哺乳類セルライ

ンにトランスフェクトする。

ファクターVIIをコードするcDNAは記載されている (Hagen等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 2412-2416, 1986)。クローンHV II 565 は38アミノ酸のブレイプロベプチドのためのコード配列を含む。このコード配列を140bpのEcoRI-Hha I断片として単離した。

プロテインC配列をp594からSst Iによる部分開裂及びEcoRIによる完全消化により単離した。コドン+7のSst I部位からcDNAの3'側のEcoRIまで延びる1540bpの断片を単離した。

次に、ファクターVII配列及びプロテインC配列を、ファクターVIIブレイプロベプチドのアミノ酸-3~-1及びプロテインCのアミノ酸1-8のコード配列を完成するオリゴヌクレオチドリinkerにより連結した。このリンカーは、配列

5' CCGGCGCGCCAACTCCTTCCTGGAGGAGCT 3'、及び5' CCTCCAGGAAGGAGTTGGCGCGCGGCG 3' を有する2個のオリゴヌクレオチドから調製した。2個のオリゴヌクレオチドをアニールし、そして四元連

結によりファクターVIIブレイプロ配列、プロテインC cDNA、及びEcoRIにより開裂されそして細菌アルカリ性ホスファターゼにより処理されたpUC9に連結した。連結されたDNAを使用してE. コリ (JM 101) を形質転換した。プラスミドDNAを調製し、そして1710bpのEcoRI断片の存在についてスクリーニングした。正しいクローンをp7/C-10と称する。

ファクターVII/プロテインC融合蛋白質を293細胞中で発現せしめた。プラスミドp7/C-10からのEcoRI挿入部をEcoRIで消化したpDXに連結した。生ずる発現ベクターを用いて前記の様に293細胞を同時トランスフェクトした。24時間の発現レベルをELISAにより測定し、そして野性型プロテインC発現造成物によりトランスフェクトされた293細胞及びトランスフェクトされていない細胞の発現レベルと比較した。結果を第5表に示す。

以下余白

第5表

蛋白質	発現レベル (ng/ml)
ファクターVII/プロテインC	1 2 3
野性型プロテインC	1 8 7
対照	< 1

プロトロンビンリーダー配列を第6表に示すオリゴヌクレオチドから調製し、そして成熟プロテインCコード配列に融合せしめた。1 μ MATPを含有する20 μ lのキナーゼ緩衝液中で5.0ngの各オリゴヌクレオチドを1ユニットの+4キナーゼと混合することによりオリゴヌクレオチドをキナーゼ処理した。37 $^{\circ}$ Cにて30分間反応を進行せしめ、次に混合物を65 $^{\circ}$ Cにて10分間加熱してキナーゼを不活性化した。

以下余白

細胞にトランスフェクトした。透明なブランクを選択し、そしてファージDNAを調製した。DNAの配列決定により正しい配列が造成されたことが確認された。

次に、プロトロンビンリーダーをプロテインC配列に連結した。合成されたリーダーを含有するファージクローンからRF DNAを調製し、そして150bpのEcoRI - SstI断片を単離した。プラスミドp594をEcoRIで完全消化し、そしてSstIで完全消化し、そして1540bpのプロテインC断片を回収した。これらの断片をEcoRIで切断したpDXと連結し、そして連結混合物を用いてコンピテントE. コリHB101細胞を形質転換した。形質転換体コロニーからプラスミドDNAを単離し、そして制限酵素消化により分析し、断片が正しい方向で組立てられたことを確認した。

以上、特定の例によりこの発明を具体的に説明したが、この発明の範囲がこれらの例に限定されるものではない。

以下余白

第6表

ZC 1323 5' CCT CCA GGA AGG AGT TGG CTC GCC GGA 3'
 ZC 1324 5' CGC GTC CGG CGA GCC AAC TCC TTC CTG GAG GAG
 CT 3'
 ZC 1378 5' AAT TCC ACC ATG GCT CAT GTG AGA GGA CTG CAA
 CTG CCT GGC TGC CTG GCT CTG GCT GCT CTG TGC AGC
 CTG GTG CAC AGC CAG CAT GTG TTC CTG GCT CCT CAG
 CAG GCC AGG AGC CTG CTG CAA 3'
 ZC 1379 5' CGC GTT GCA GCA GGC TCC TGG CCT GCT GAG GAG
 CCA GGA ACA CAT GCT GGC TGT GCA CCA GGC TGC ACA
 GAG CAG CCA GAG CCA GGC AGC CAG GCA GTT GCA GTC
 CTC TCA CAT GAG CCA TGG TGG 3'

次に、プロトロンビンリーダーを組み立てた。EcoRI及びSstIで切断された5.0ngのMBp19を2.5ngずつのキナーゼ処理されたオリゴヌクレオチドと、1 μ MATP及び4ユニットのT4リガーゼを含有する20 μ lの1 \times リガーゼ緩衝液中で混合した。この混合物を15 $^{\circ}$ Cにて48時間インキュベートし、そしてコンピテントE. コリJM101

4. 図面の簡単な説明

第1図は pHCA 6L中のプロテインC cDNA の部分的制限地図である。コード領域は空箱で示されている。

第2-1図~第2-3図は完全なプロテインC cDNAのヌクレオチド配列及びプロテインCの推定アミノ酸配列を示す。矢印は連結ジペプチド及び活性化ジペプチドの除去のための開裂部位を示す。

第3図はヒトプロテインCをコードするゲノムDNAの制限酵素地図を示す。線の下の数値は長さキロベース (kb) を示す。

第4-1図~第4-4図はヒトプロテインC遺伝子のエクソン及びイントロンを含む完全なゲノム配列を示す。矢印はイントロン-エクソンのスプライス連結部を示す。3'末端のA-T-T-A-A-A及びA-A-T-A-A-Aのポリアデニレーション又はプロセシング配列が箱で示されている。◆: 可能性ある炭水化物付着部位、▲: 連結ジペプチドのプロセシングのための見かけ上の開裂部位、↓: プロテインCが活性化されたプロテインCに転換さ

れる際の開裂部位、及び●：ポリアデニレーションの部位が示されている。

第5図はヒトプロテインCの構造の概略の二次元モデルを示す。

第6図はプロテインCの部分的cDNAクローンの5'部分及び3'部分のサブクローニングを示す。

第7図はゲノムクローンからのイントロンAの除去によるエクソンIとエクソンIIの融合を示す。

第8図は第1図のcDNA挿入部の5'末端へのエクソンI及びIIの融合を示す。

第9図はプロテインCの完全なコード配列を含んで成るプラスミドの造成を示す。

第10図は発現ベクター-pD7Cを示す。使用されている記号は、ori=アデノウイルス5'0-1マップユニット配列；E=SV40エンハンサー；Ad2MLP=アデノウイルス2主要後期プロモーター；L1-3=アデノウイルス2三分節(tripartite)リーダー；5'ss=5'スプライス部位；3'ss=3'スプライス部位；pA=SV40初期ポリアデニレーションシグナル；及びΔ=pBR322“毒性”

配列の除去された部分、を示す。

第11図は発現ベクター-pD5(PC-DHFR^r)を示す。DHFR^rはメトトレキセート耐性変異ジドロフォレートレダクターゼ遺伝子配列を示し；そしてpAはSV40後期ポリアデニレーションシグナルを示す。他の記号は第10図について記載した通りである。

第12図は発現ベクター-pDX/PCを示す。記号は第11図について記載した通りである。

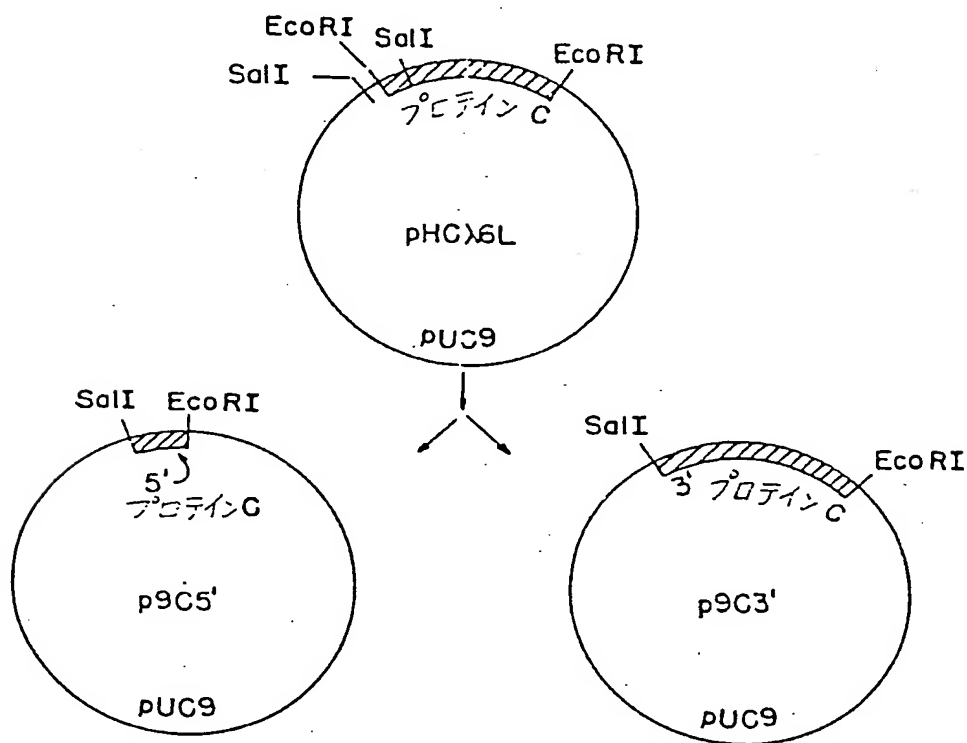
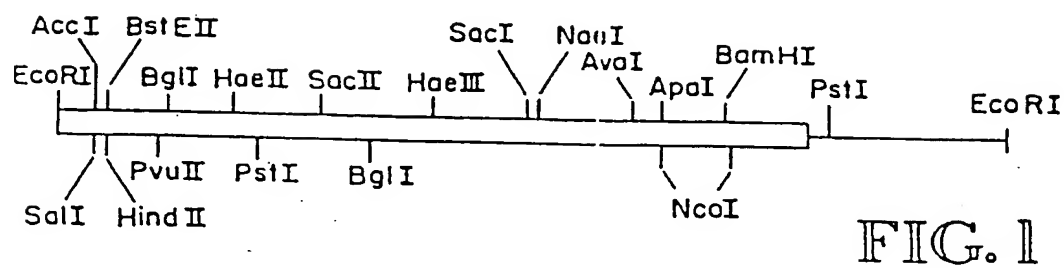
第13図はトランスフェクトされた293細胞からの培地サンプルでの活性化されたプロテインCのアッセイの結果を示す。

第14図は発現ベクター-pDX/PC962及びPC962/229を示す。

第15図はこの発明の幾つかの態様に従って製造されたプロテインCの抗凝固活性を示す。

以下余白

(図面の浄書内容に変更なし)



GGCTGTCATG GCGGCAGGAC GGCGAACTTG CAGTATCTCC ACGACCCGCC CCTGTGCCAG TGCCTCCAGA

-42 -40 -30
ATG TGG CAG CTC ACA AGC CTC CTG CTG TTC GTG GCC ACC TGG GGA ATT TCC GGC
MET Trp Gln Leu Thr Ser Leu Leu Leu Phe Val Ala Thr Trp Gly Ile Ser Gly

-20 -10
ACA CCA GCT CCT CTT GAC TCA GTG TTC TCC ATC AGC GAG CGT GCC CAC CAG GTG
Thr Pro Ala Pro Leu Asp Ser Val Phe Ser Ser Ser Glu Arg Ala His Gln Val

-1 +1 10
CTG CGG ATC CGC AAA CGT GCC AAC TCC TTC CTG GAG GAG CTC CGT CAC AGC AGC
Leu Arg Ile Arg Lys Arg Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Leu Arg His Ser Ser

20 30
CTG GAG CGG GAG TGC ATA GAG GAG ATC TGT GAC TTC GAG GAG GCC AAG GAA ATT
Leu Glu Arg Glu Cys Ile Glu Glu Ile Cys Asp Phe Glu Glu Ala Lys Glu Ile

40
TTC CAA AAT GTG GAT GAC ACA CTG GCC TTC TGG TCC AAG CAC GTC GAC GGT GAC
Phe Gln Asn Val Asp Asp Thr Leu Ala Phe Trp Ser Lys His Val Asp Gly Asp

50 60
CAG TGC TTG GTC TTG CCC TTG GAG CAC CCG TGC GCC AGC CTG TGC TGC GGG CAC
Gln Cys Leu Val Leu Pro Leu Glu His Pro Cys Ala Ser Leu Cys Cys Gly His

70 80
GGC ACG TGC ATC GAC GGC ATC GGC AGC TTC AGC TGC GAC TGC CGC AGC GGC TGG
Gly Thr Cys Ile Asp Gly Ile Gly Ser Phe Ser Cys Asp Cys Arg Ser Gly Trp

90 100
GAG GGC CGC TTC TGC CAG CGC GAG GTG AGC TTC CTC AAT TGC TCG CTG GAC AAC
Glu Gly Arg Phe Cys Gln Arg Glu Val Ser Phe Leu Asn Cys Ser Leu Asp Asn

110 120
GGC GGC TGC ACG CAT TAC TGC CTA GAG GAG GTG GGC TGG CGG CGC TGT AGC TGT
Gly Gly Cys Thr His Tyr Cys Leu Glu Glu Val Gly Trp Arg Arg Cys Ser Cys

130
GCG CCT GGC TAC AAG CTG GGG GAC GAC CTC CTG CAG TGT CAC CCC GCA GTG AAG
Ala Pro Gly Tyr Lys Leu Gly Asp Asp Leu Leu Gln Cys His Pro Ala Val Lys

140 150
TTC CCI TGT GGG AGG CCC TGG AAG CGG ATG GAG AAG AAG CGC AGT CAC CTG AAA
Phe Pro Cys Gly Arg Pro Trp Lys Arg Met Glu Lys Lys Arg Ser His Leu Lys

160 170
CGA GAC ACA GAA GAC CAA GAA GAC CAA GTA GAT CCG CGG CTC ATT GAT GGG AAG
Arg Asp Thr Glu Asp Gln Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys

FIG.2-1

180 ATG ACC AGG CCG GGA GAC AGC CCC TGG CAG GTG GTC CTG CTG GAC TCA AAG AAG
 Met Thr Arg Arg Gly Asp Ser Pro Trp Gln Val Val Leu Leu Asp Ser Lys Lys
 190
 200 AAG CTG GCC TGC GGG GCA GTG CTC ATC CAC CCC TCC TGG GTG CTG ACA GCG GCC
 Lys Leu Ala Cys Gly Ala Val Leu Ile His Pro Ser Trp Val Leu Thr Ala Ala
 210
 220 CAC TGC ATG GAT GAG TCC AAG AAG CTC CTT GTC AGG CTT GGA GAG TAT GAC CTG
 His Cys Met Asp Glu Ser Lys Lys Leu Leu Val Arg Leu Gly Glu Tyr Asp Leu
 230
 240 CCG CGC TGG GAG AAG TGG GAG CTG GAC CTG GAC ATC AAG GAG GTC TTC GTC CAC
 Arg Arg Trp Glu Lys Trp Glu Leu Asp Leu Asp Ile Lys Glu Val Phe Val His
 250
 260 CCC AAC TAC AGC AAG AGC ACC ACC GAC AAT GAC ATC GCA CTG CTG CAC CTG GCC
 Pro Asn Tyr Ser Lys Ser Thr Thr Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu His Leu Ala
 270
 280 CAG CCC GCC ACC CTC TCG CAG ACC ATA GTG CCC ATC TGC CTC CCG GAC AGC GGC
 Gln Pro Ala Thr Leu Ser Gln Thr Ile Val Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ser Gly
 290
 300 CTT GCA GAG CGC GAG CTC AAT CAG GCC GGC CAG GAG ACC CTC GTG ACG GGC TGG
 Leu Ala Glu Arg Glu Leu Asn Gln Ala Gly Gln Glu Thr Leu Val Thr Gly Trp
 310
 320 GGC TAC CAC AGC AGC CGA GAG AAG GAG GCC AAG AGA AAC CGC ACC TTC GTC CTC
 Gly Tyr His Ser Ser Arg Glu Lys Glu Ala Lys Arg Asn Arg Thr Phe Val Leu
 330
 340 AAC TTC ATC AAG ATT CCC GTG GTC CCG CAC AAT GAG TGC AGC GAG GTC ATG ACC
 Asn Phe Ile Lys Ile Pro Val Val Pro His Asn Glu Cys Ser Glu Val Met Ser
 350
 360 AAC ATG GTG TCT GAG AAC ATG CTG TGT GCG GGC ATC CTC GCG GAC CGG CAG CAT
 Asn Met Val Ser Glu Asn Met Leu Cys Ala Gly Ile Leu Gly Asp Arg Gln Asp
 370
 380 GCC TGC GAG GGC GAC AGT GGG GGG CCC ATG GTC GCC TCC TTC CAC GGC ACC TGG
 Ala Cys Glu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Met Val Ala Ser Phe His Gly Thr Trp
 390
 400 TTC CTG GTG GGC CTG GTG AGC TGG GGT GAG GGC TGT GGG CTC CTT CAC AAC TAC
 Phe Leu Val Gly Leu Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Gly Leu Leu His Asn Tyr
 GGC GTT TAC ACC AAA GTC ACC CGC TAC CTC GAC TGG ATC CAT GGC CAC ATC AGA
 Gly Val Tyr Thr Lys Val Ser Arg Tyr Leu Asp Trp Ile His His Ile Arg

FIG. 2-2

410
GAC AAG GAA GCC CCC CAG AAG AGC TGG GCA CCT TAG CGACCCCTCCC TGCAGGGGCTG
Asp Lys Glu Ala Pro Gln Lys Ser Trp Ala Pro
GGCTTTTGCA TGGCAATGGA TGGGACATTA AAGGGACATG TAACAAGCAC ACCGGCCTGC TGTTCGTGCC
TTCCATCCCT CTTTGGGCT CTTCGGAGG GAAGTAACAT TTAGTGAGCA CCTGTTGTAT GTCACATGCC
TTATGAATAG AATCTTAACT CCTAGAGCAA CTCTGTGGGG TGGGGAGGAG CAGATCCAAG TTTTGGGGG
TCTAAAGCTG TGTGTGTTGA GGGGGATACT CTGTTTATGA AAAAGAATAA AAAACACAAC CAGGAAAAA

FIG. 2-3

FIG. 3

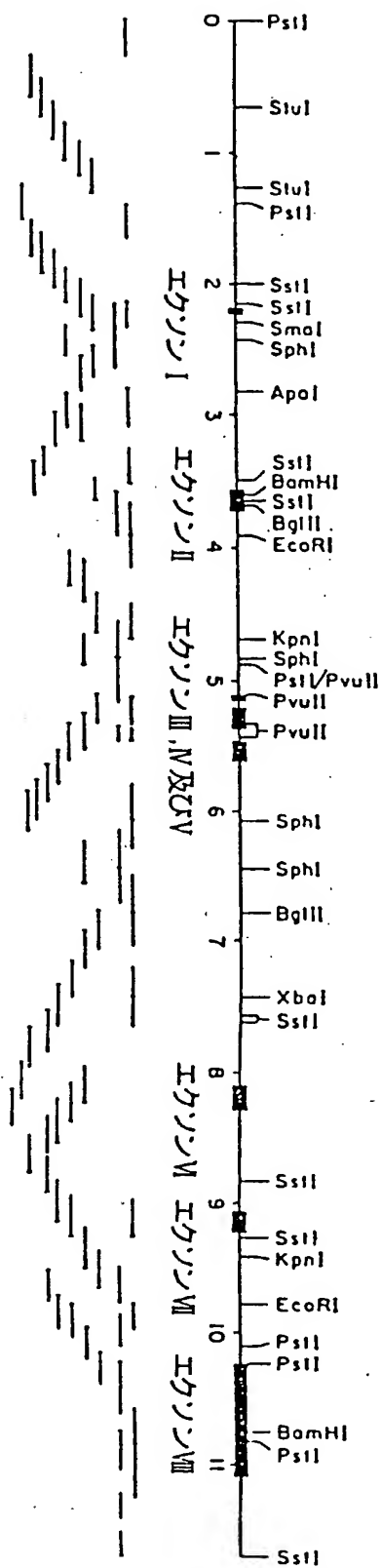


FIG. 4-1

-92

02-

-19-

13

37

Phe Glu Glu Ala Lys Glu Ile Phe Phe Glu Asn Val Asp Asp Thr
 CTACGCGCC CATCGCTCCA GAGCATGAGG CTACGGGGG AGCTCGTAA CAGCAGGGCC CTCGAGGAGC 1570

- 778 -

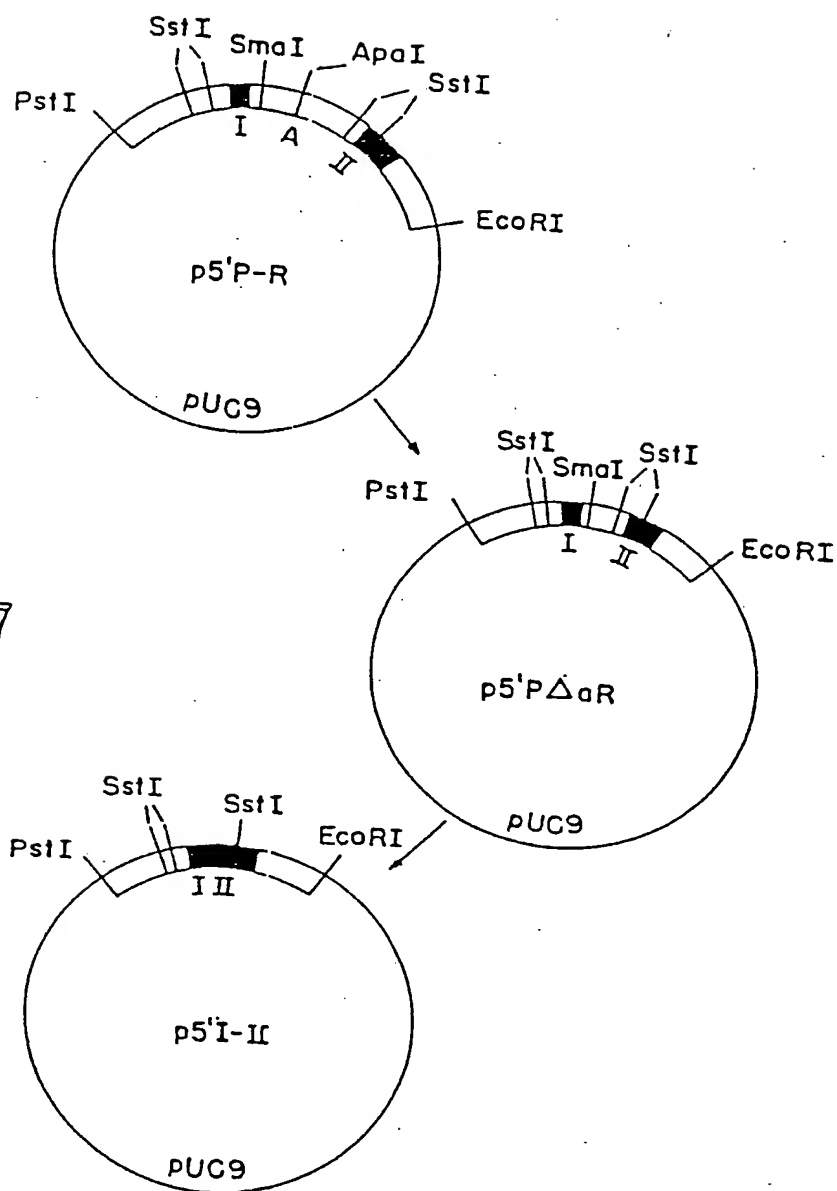
FIG. 4-3

Ile Val Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ser Gly Leu Ala Glu Arg Glu Leu Asn Gln Ala Gly Gln Glu Thr Leu Val Thr Gly Trp Gly Tyr His Ser Ser Arg Glu
 ATA GTG CCC ATC TGC TGC CCG GAC AGC AGC CTT GCA GAG CCC GAG CTC AAT CAG GCC GGC CAG GAG ACC CTC GTG ACC GGC TGG GGC TAC CAC AGC AGC CGA GAG
 Lys Glu Ala Lys Arg Asn Arg Thr Phe Val[◆] Leu Asn Phe Ile Lys Ile Pro Val Val Pro His Asn Glu Cys Ser Glu Val Met Ser Asn Met Val Ser Glu Asn
 AAG GAG GCC AAG AGA AAC CGC ACC TTC GTC CTC AAC TTC ATC AAG ATT CCC GTG GTC CCG CAC AAT CAG TGC AGC GAG GTC ATG AGC AAT GTG TCT GAG AAC
 Met Leu Cys Ala Gly Ile Leu Gly Asp Arg Gln Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Met Val Ala Ser Phe His Gly Thr Trp Phe Leu Val Gly Leu
 ATG CTG TGT GCG GGC ATC CTC GGC GAC CCG GAG GAT GCC TGC GAG GGC GAC AAT GGC GGC CCC ATG GTC GCC TCC TTC CAC GGC ACC TGG TTC CTG GTC GGC CTG
 Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Gly Leu Leu His Asn Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val Ser Arg Tyr Leu Asp Trp Ile His Gly His Ile Arg Asp Lys Glu Ala
 GTG AGC TGG GGT GAG GGC TGT GGC CTC CTT CAC AAC TAC GGC GTT TAC ACC AAA GTC AGC CGC TAC CTC GAC TGG ATC CAT GGG CAC ATC AGA GAC AAG GAA GCC
 Pro Gln Lys Ser Trp Ala Pro STOP
 CCC CAG GAG AGC TGG GCA CCT TAG CGACCTCCC TGCAGGCTG GCCTTTTCCA TGGCAATGCA TGGGACATTA AGGGGACATG TAAACAGCAC ACCGGCTGC TGTCTGTCC TTCCATCCCT
 CTTTGGGCT CTTCGCGG GAAGTAACAT TTACTGAGCA CCTGTGTAT GTACATGCC TTATGAATAG AATCTTAAT CTACAGCAA CTCGTGGGG TGGGGAGGAG CAGATCCAG TTTTGGGGG
 TCTAAGCTG TGTGTGTTGA GGGGATACT CTGTTATGA AAAAGCTTA AAAACACAA CACGAGCCA CTAGAGCCTT TTCCAGGCT TGGGAGAG CCTGTCCAG CCGGATGC TGAAGGTGAG 9075
 CCTTGACCAG CTTTCAGCT AGCCAGCTA TGAAGTAGAC ATGTTAGCT CATATCAG AGAGGAAAC TCAGGGGTCT GAAGGTTTA CATGGTGGAG CCAGGATTCA AATCTAGGTC TCATCCCAA 9205
 ACCCAGGTGC TTTTTCGT TCTCAGTGT CCTGGAGGAC AGCTGTTTC ACCTGCTCA GTGTGGGCG CACTATTAGC TCTGTAGGCA AGCAGCCACA CACCCAGAAA GTGTGGTTC ACCECAAT 9335
 9465 9595

FIG. 4-4

[illegible]

FIG. 7



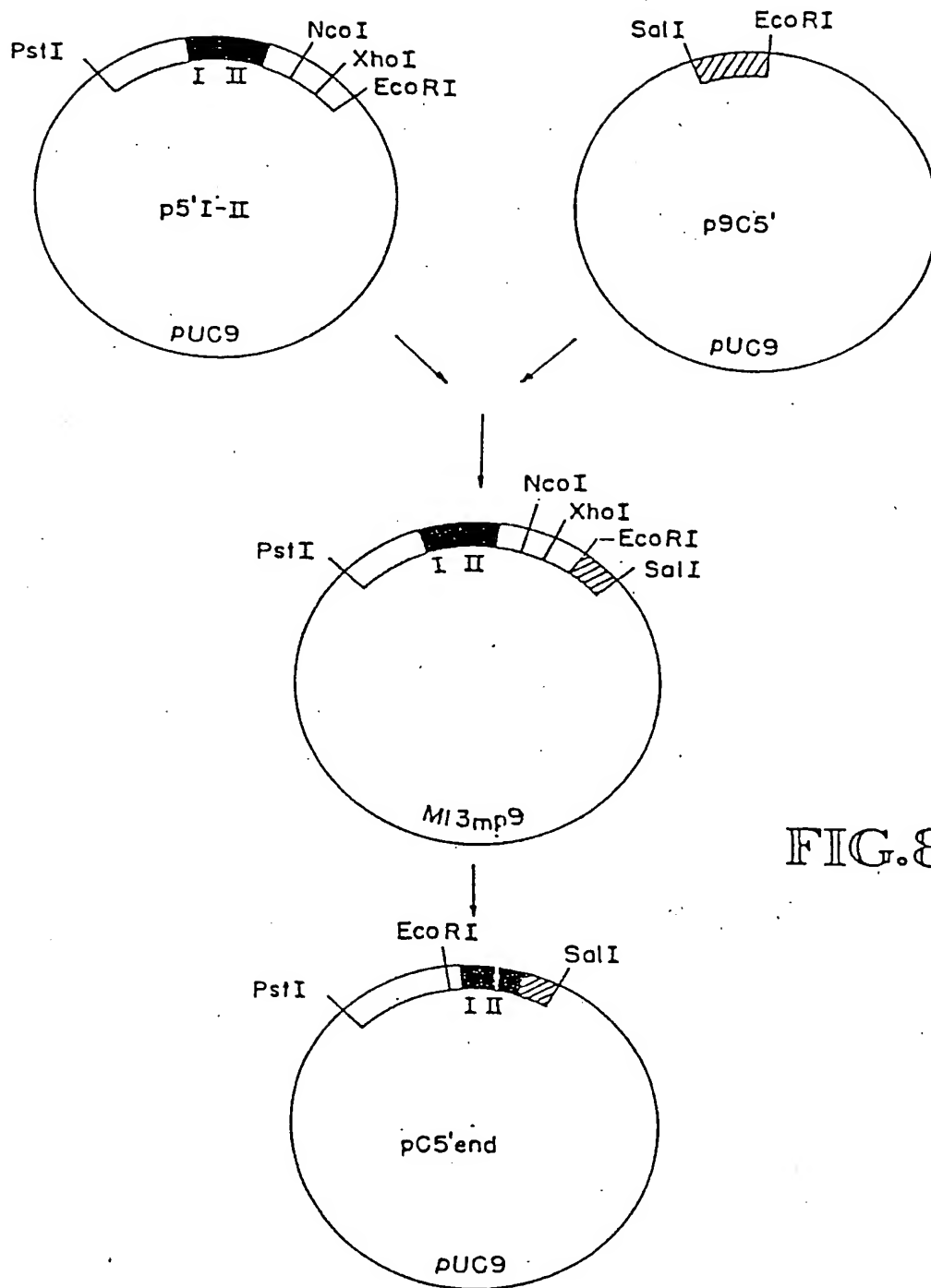


FIG.8

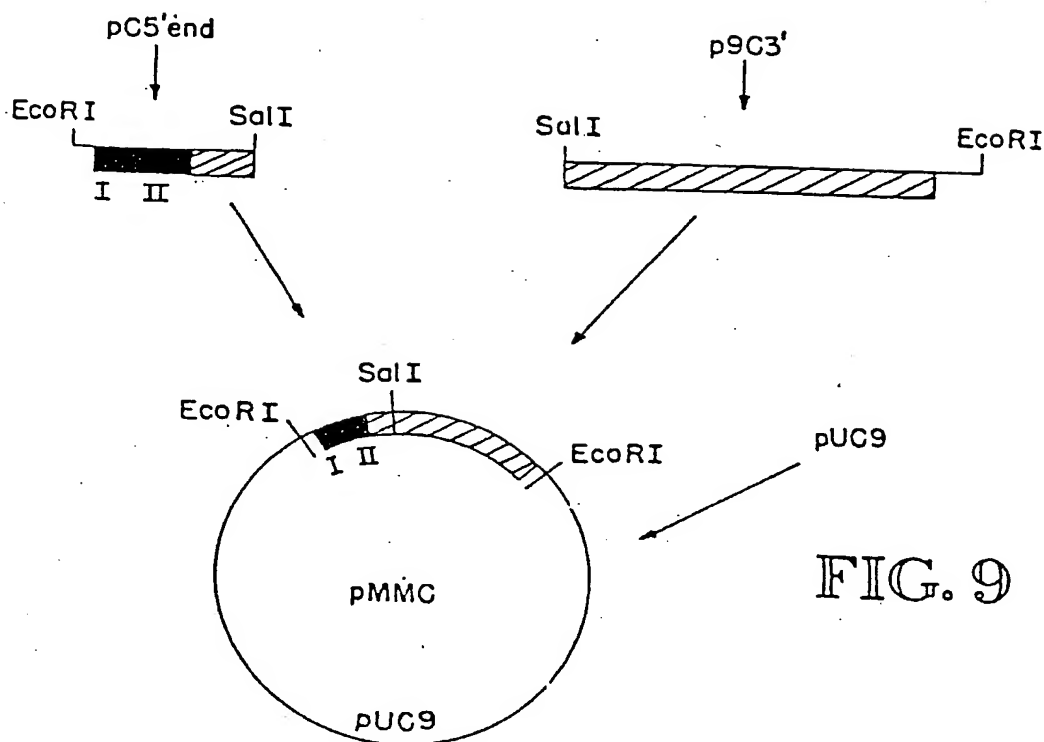


FIG. 9

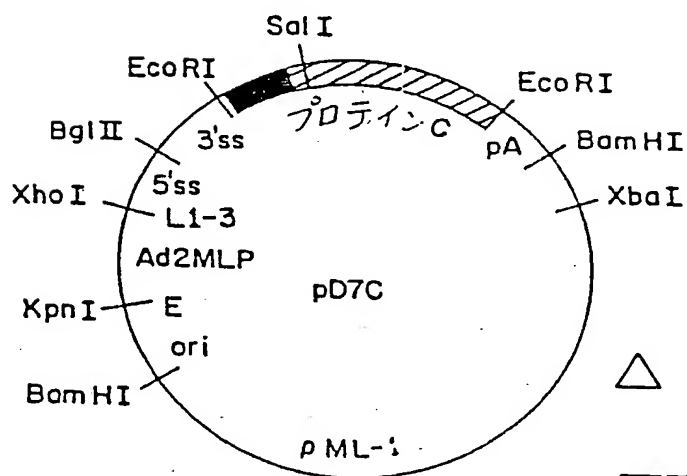


FIG. 10

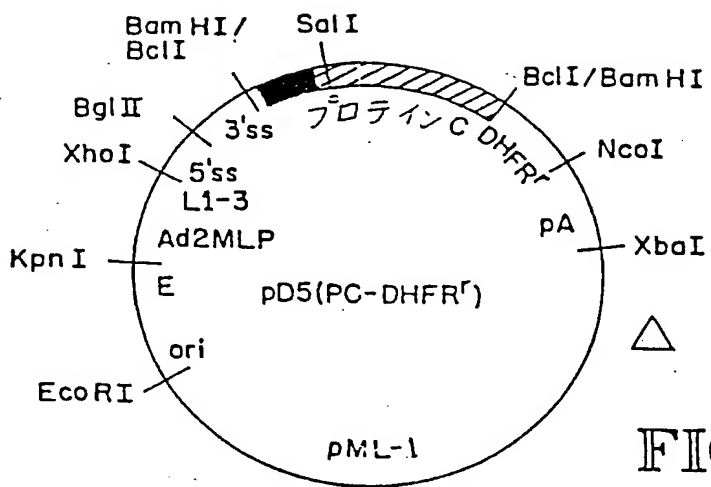


FIG. 11

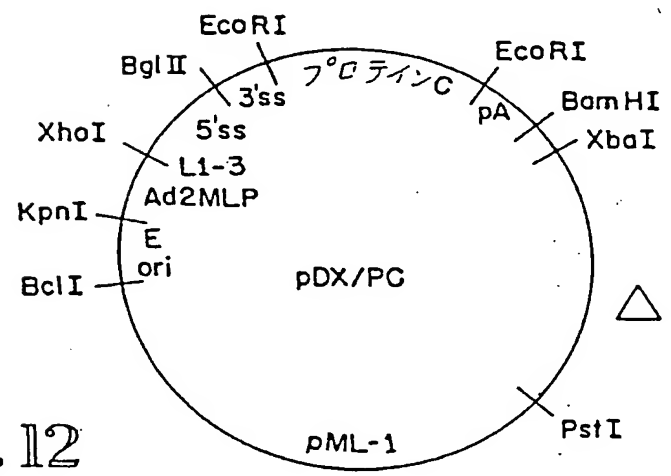


FIG. 12

FIG.13

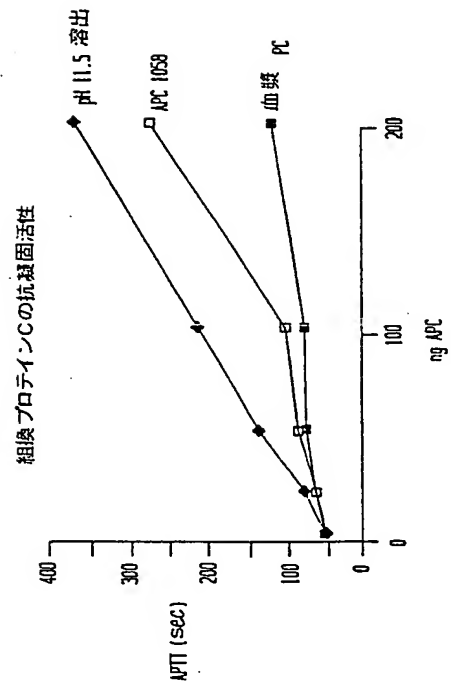
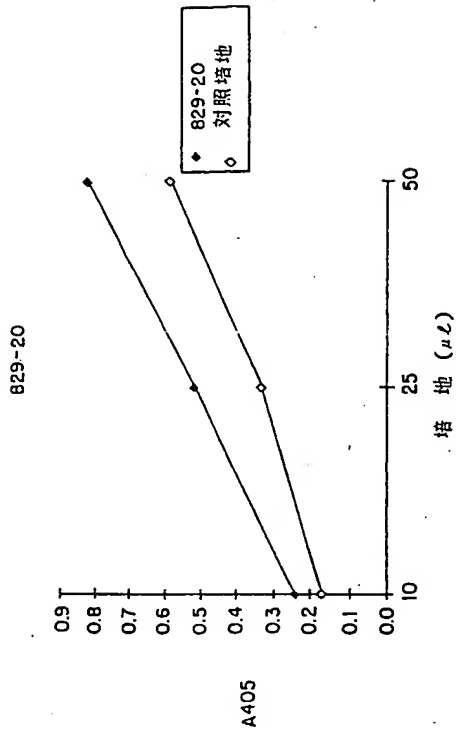


FIG.15

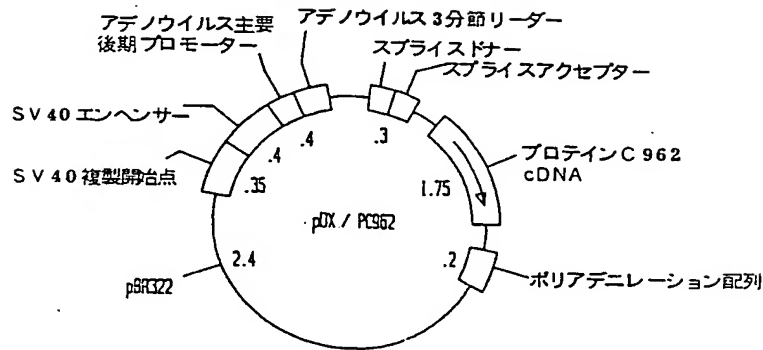
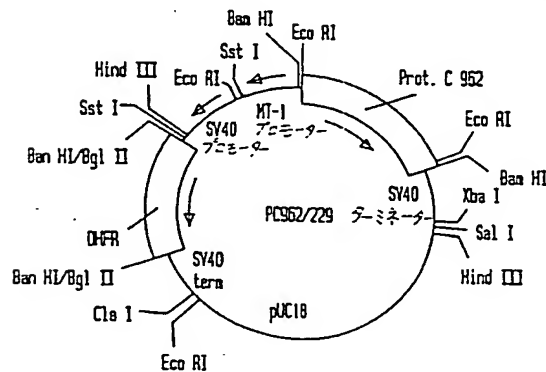


FIG.14



⑤Int.Cl.⁴

厅内整理番号

⑫発 明 者 キヤスリーン エル, アメリカ合衆国, ワシントン 98199, シアトル, トウ
バークナー エンテイセカンド アベニュー ウェスト 3032

6. 補正の対象

(1) 願書の「出願人の代表者」の欄

特許庁長官 小 川 邦 夫 殿

(3) 函 面

7. 補正の内容

(1)(2) 別紙の通り

(3) 図面の浄書（内容に変更なし）

3. 補正をする者

事件との関係

名称 ザイモジェネティクス・
インコーポレイティド

4. 代理人

住所 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号
静光虎ノ門ビル 電話 504-0721

氏名 弁理士 (6579) 青 木 朗

(外 4 名)

5. 補正命令の日付

昭和 63 年 1 月 26 日 (発送日)

8. 添附書類の目録

(1) 訂正願書 1 通

(2) 委任状及び訳文 各 1 通

(3) 淨書圖面 1 通

- 787 -

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.